

# **Efecto de una dieta suplementada con microcápsulas de probióticos y quercetina en ratones APC<sup>Min/+</sup>.**

**Iván Benito Peñalver**

Pamplona 2013





Departamento de  
Ciencias del Medio Natural

Natura Ingurunearen Zientziak  
Saila

## **Efecto de una dieta suplementada con microcápsulas de probióticos y quercetina en ratones APC<sup>Min/+</sup>.**

Memoria presentada por D. Iván Benito Peñalver para aspirar al grado de  
Doctor por la Universidad Pública de Navarra

Pamplona 2013





**D. Florencio Marzo Pérez**, Catedrático de Universidad del área de Zoología en el Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra, y **D. Francisco C. Ibáñez Moya**, Profesor Titular del área de Nutrición y Bromatología en el Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra,

**HACEN CONSTAR:**

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “**Efecto de una dieta suplementada con microcápsulas de probióticos y quercetina en ratones APC<sup>Min/+</sup>**” que presenta **D. Iván Benito Peñalver** para optar al título de Doctor, se ha desarrollado bajo nuestra dirección en el Laboratorio de biología, fisiología y nutrición animal, adscrito al Área de Zoología del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

Pamplona, Octubre 2013

Fdo. Dr. Florencio Marzo Pérez

Fdo. Dr. Francisco C. Ibáñez Moya



## **Financiación**

El presente trabajo se ha realizado en el Laboratorio de biología, fisiología y nutrición animal de la Universidad Pública de Navarra, en el marco del proyecto “MODULACION NUTRICIONAL DEL CANCER DE COLON MEDIANTE UNA BEBIDA LACTEA ENRIQUECIDA CON UN SIMBIOTICO”, financiado por el ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-10296-C02-01). Durante la realización de este trabajo, Iván Benito Peñálver ha disfrutado durante dos años de una beca de formación de tecnólogos del departamento de Industria y Tecnología, Comercio y Trabajo del Gobierno de Navarra y ha sido ayudante de proyecto en el grupo de investigación del Laboratorio de biología, fisiología y nutrición animal de la Universidad Pública de Navarra.



## Agradecimientos

He tenido la suerte de tener a muchas personas a mi alrededor que me han apoyado durante la realización de esta tesis doctoral, empezando por mis directores, quienes me dieron la oportunidad de trabajar en un campo que me apasiona. Gracias Florencio, por confiar en mí, por preocuparte de mi futuro y por todos los consejos que me has dado a lo largo de todo este tiempo. Gracias Patxi, por inculcarme que debo tener hambre de aprender, por tus consejos y por tu disponibilidad.

Además, quiero mostrar mi agradecimiento al doctor Ignacio Encío, por acogerme en su laboratorio durante una parte de esta tesis, tratándome en todo momento como a uno más de sus doctorandos y a pesar de la falta de tiempo tener siempre un hueco para cualquier consulta. Al doctor Fermín Milagro que desde la distancia haya estado pendiente del transcurso de esta tesis doctoral, brindándome en todo momento su apoyo. Gracias también a la Dra. Ana Martínez-Peñuela por su ayuda en la realización e interpretación de los análisis histológicos.

De mis compañeras del laboratorio de Ciencias del Medio Natural me llevo un gran recuerdo y espero que nuestra relación no acabe aquí. Gracias Patricia, por encargarte de mi cuando llegué recién salido de la universidad y ayudarme en mis primeros pasos por el laboratorio. María, nuestras tesis han llevado un camino paralelo y hemos compartido muchas horas de trabajo, con sus buenos momentos y también alguno de desesperación. Muchas gracias por tus consejos, tu apoyo y por ofrecerme tu ayuda siempre que la he necesitado, sin necesidad de pedirla. Te estoy enormemente agradecido. Nerea, gracias por tu buen humor y disposición a echarme una mano. Gracias a Conchi y a Susana por su inestimable ayuda. Por supuesto, también me acuerdo de todos con los que he coincidido en mi paso por el laboratorio de Ciencias de la Salud, Mirja, Ido, María José, las dos Irantzu, Esther, Dani, Jon y Ronces. Muchas gracias por hacer tan ameno el trabajo, ha sido un placer coincidir con vosotros, tanto en el aspecto profesional como personal. Gracias Jon por tu ayuda con la técnica de RT-qPCR y como trabajar con esa montonera de datos. Si no llega a ser por tu ayuda no habría sabido ni por donde empezar. Muchas gracias.

Llegado este momento surgen los recuerdos de los últimos cursos de carrera, aquellos en los que comenzábamos a pensar en nuestro futuro. Aunque en ese momento nos pareciese lejano, ese “futuro” ya ha llegado y aquel grupo de amigos que durante los años de carrera fue creciendo poco a poco, una vez finalizada la carrera comenzó a dispersarse por el mundo. A pesar de que la distancia y las obligaciones hacen que cada vez sea más difícil coincidir, espero que jamás perdamos la amistad. Muchas gracias a todos por los buenos momentos que hemos pasado.

Gracias a todos mis amigos, por aguantar mis charlas a pesar de que en general no entendíais de que demonios estaba hablando, gracias por vuestro apoyo y por hacerme desconectar.

Finalmente, pero en absoluto menos importante, quiero agradecer a mis padres, a mis hermanos, a mi tía Mari y a mis abuelos, su apoyo incondicional. Me habéis enseñado con vuestro ejemplo que aquello que queremos únicamente se consigue con esfuerzo. Siempre me habéis animado a hacer aquello que me gustase y habéis hecho todo lo posible por ayudarme a conseguir mis metas. Estoy muy orgulloso de vosotros. Gracias Iñaki, como hermano mayor siempre has estado pendiente de mí. Quiero que sepas que para mí ha sido una suerte tenerte como espejo en el que mirarme. Se que una de las personas que más orgullosa se siente de mí, es mi hermano pequeño Pavlo, a pesar de que también es el que más ha sufrido durante estos últimos meses mi falta de tiempo. Gracias por no tenérmelo en cuenta.







El que aprende y aprende y no practica lo que aprende, es como el que ara y ara y nunca siembra.

(PLATÓN)



A mi familia



## Resumen

### Introducción.

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más frecuente en hombres y el segundo en mujeres, siendo mayor su incidencia en países desarrollados. La dieta tiene un efecto destacado en el desarrollo de la enfermedad. Así, dietas ricas en grasas saturadas y carnes rojas incrementan el riesgo de la misma, mientras que las ricas en verduras y frutas frescas reducen su incidencia. Este efecto de vegetales se debe, en parte, a su contenido en polifenoles. La quercetina es el polifenol más abundante en la dieta humana y esta presente en vegetales y sus derivados de consumo habitual. Los principales efectos fisiológicos son su capacidad antioxidante y su actividad anticarcinogénica. Por otra parte, la microbiota intestinal contribuye positivamente al mantenimiento de la salud. La administración de probióticos tiene un efecto favorable sobre la microbiota intestinal. Los probióticos de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se consideran beneficiosos para la fisiología intestinal.

### Objetivo

En el presente trabajo se investigó el posible efecto beneficioso de la suplementación de dietas con los probióticos *Bifidobacterium bifidum* (*Bf*) y *Lactobacillus gasseri* (*Lg*) microencapsulados, con o sin quercetina microencapsulada, en la fisiología de animales APC<sup>Min/+</sup> que desarrollan cáncer colorrectal.

### Material y métodos

Se utilizaron 12 ratones de la cepa C57BL6/J alimentados con dieta control (grupo C1), y 36 ratones de la cepa C57BL6/J-Apc<sup>Min/+</sup> distribuidos en tres grupos experimentales: C2 (n=12), alimentado con dieta control; E1 (n=12), alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; y E2 (n=12), alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina.

El período experimental fue de diez semanas y media. Se registró el peso corporal de los animales y se analizó por calorimetría indirecta el metabolismo energético de los mismos. En muestras de heces se realizaron pruebas de detección de sangre oculta y recuento bacteriológico. Se realizaron estudios histológicos de colon. Se determinó la actividad enzimática en yeyuno y se cuantificó la concentración de SGLT-1 y PEPT-1 mediante Western blot. En muestras de colon se analizó la transcripción de genes implicados en la vía WNT mediante RT-qPCR *arrays* y también la expresión de la proteína  $\beta$ -catenina mediante Western blot.

## Resultados

Los animales APC<sup>Min/+</sup> que se alimentaron con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, con o sin quercetina, presentaron una menor pérdida de peso corporal que el grupo de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control. Asimismo, dichas dietas suplementadas redujeron el sangrado intestinal y el número de lesiones preneoplásicas en la mucosa de colon, siendo más efectiva la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina. Por otra parte, la suplementación de la dieta con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina incrementó las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el contenido del ciego, lo que indica que la quercetina podría estimular el crecimiento de este tipo de microorganismos beneficiosos para la salud intestinal. La actividad de las enzimas sacarasa y maltasa y la expresión del transportador SGLT-1 se redujeron en los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control, presentando valores similares a la cepa salvaje. En comparación con la cepa salvaje, los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control presentan diferencias significativas en la expresión de 32 genes. Por su parte, las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg* o con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina inducen la recuperación de la expresión en 17 y 24 de estos genes, respectivamente. Además, es destacable que la alimentación de los animales APC<sup>Min/+</sup> con las dietas suplementadas modifica significativamente la transcripción de algunos genes implicados en la regulación de la degradación de la proteína  $\beta$ -catenina. Este hecho se acompaña con una reducción de acumulación de  $\beta$ -catenina en colon respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control, recuperándose niveles similares a la cepa salvaje. La menor acumulación de  $\beta$ -catenina explicaría el menor desarrollo de lesiones intestinales en la mucosa colónica de los animales alimentados con dietas suplementadas.

## Conclusión.

Las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* solos, o en combinación con quercetina microencapsulada, tienen un efecto beneficioso sobre múltiples parámetros relacionados con el desarrollo del cáncer colorrectal, como son la pérdida de peso corporal y tejido adiposo, sangrado intestinal y alteraciones en la absorción de glúcidos. Además reducen el número de lesiones intestinales en la mucosa del colon, lo que demuestra su efecto preventivo. Dicha reducción podría ser consecuencia de la disminución de expresión de la proteína  $\beta$ -catenina, que a su vez se puede relacionar con la capacidad de las dietas suplementadas de modificar la expresión de genes implicados en el mecanismo de degradación.







## Abreviaturas

---



## ABREVIATURAS

## A

- ACF-** Focos de criptas aberrantes, (de *Aberrant Crypt Foci*).
- Actb-**  $\beta$ -actina, (de *Actin, beta*).
- Aes-** Símbolo oficial del gen codificador de la proteína Aes, (de *Amino-terminal enhancer of splits*).
- AOM-** Azoximetano, (de *Azoxymethane*).
- APC-** Símbolo oficial del gen supresor de tumores APC, (de *Adenomatous polyposis coli*).
- APN-** Aminopeptidasa N, (de *Aminopeptidase N*).
- Axin1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Axina 1, (de *Axin1*).

## B

- Bcl9-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Bcl9, de (*B cell CLL/lymphoma 9*).
- Bf-** *Bifidobacterium bifidum*.
- Btrc-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Btrc, (de *Beta-transducin repeat containing protein*).

## C

- Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>- ATPasa-** Calcio magnesio ATPasa.
- CBP/p300-** Proteína de unión a CREB, (de *CREB binding protein*).
- Ccnd1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Ciclina d1, (de *cyclin D1*).
- Ccnd2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Ciclina d2, (de *cyclin D2*).
- Ccnd3-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Ciclina d3, (de *cyclin D3*).
- CCR-** Cáncer colorectal.

**CK1 $\alpha$ -** Isoforma alfa de la proteína casein quinasa 1, (de *Casein Kinase 1 $\alpha$* ).

**C-Myc-** Oncogen c-Myc, (de *Myelocytomatosis oncogene*).

**COX-1-** Ciclooxygenasa 1, (de *cyclooxygenase 1*).

**COX-2-** Ciclooxygenasa 2, (de *cyclooxygenase 2*).

**CR-** Cociente Respiratorio.

**Csnk1a1-** Símbolo oficial del gen que codifica la isoforma alfa de la proteína caseína quinasa 1, (de *Casein kinase 1, alpha 1*).

**Csnk1d-** Símbolo oficial del gen que codifica la isoforma delta de la proteína caseína quinasa 1, (de *Casein kinase 1, delta*).

**Csnk2a1-** Símbolo oficial del gen que codifica la subunidad alfa de la proteína caseína quinasa 2, (de *Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide*).

**Ctbp1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Ctbp1, (de *C-terminal binding protein 1*).

**Ctbp2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Ctbp2, (de *C-terminal binding protein 2*).

**CTNNB-1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína  $\beta$ -catenina, (de *catenin beta 1*).

**Ctnnbip1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína 1 de interacción con  $\beta$ -catenina, (de *Catenin beta interacting protein 1*).

## D

**Daam1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Daam 1, (de *Dishevelled associated activator of morphogenesis 1*).

**DEPC** *Dyethyl pyrocarbonate*.

**DMH-** 1,2- dimetilhidrazina, (de 1,2-*Dimethylhydrazine*).

**Dixdc1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Dixdc1, (de DIX domain containing 1).

**DKK-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína inhibidora de la vía de señalización WNT Dickkopf, (de dickkopf WNT signaling pathway inhibitor).

**DPP-IV-** Dipeptidilpeptidasa IV.

**Dvl1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Dvl1, (de dishevelled, dsh homolog 1 (*Drosophila*)).

**Dvl2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Dvl2, (de dishevelled, dsh homolog 2 (*Drosophila*)).

## E

**Ep300-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Ep300, (de E1A binding protein p300).

## F

**Fbxw2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Fbxw 2, (de F-box and WD-40 domain protein 2).

**Fbxw4-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Fbxw 4, (de F-box and WD-40 domain protein 4).

**Fbxw11-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Fbxw11, (de F-box and WD-40 domain protein 11).

**Fgf4-** Símbolo oficial del gen que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos 4, (de Fibroblast growth factor 4).

**Fosl1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Fosl1, (de Fos-like antigen 1).

**Foxn1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Foxn1, (de Forkhead box N1).

**Frat1-** Símbolo oficial del gen que codifica el proto-oncogen Frat 1, (de Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas).

**Frzb-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Frzb, (de Frizzled-related protein).

**Fshb-** Símbolo oficial del gen que codifica la hormona estimulante de folículos beta,

(de Follicle stimulating hormone beta).

**Fzd-** Genes que codifican proteínas homólogas de Frizzled (*Drosophila*), (de Frizzled homolog *Drosophila*).

## G

**Gapdh-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa, (de Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

**GDP-** Guanosín difosfato, (de guanosine diphosphate).

**GLUT2-** Transportador de glucosa tipo 2, (de glucose transporter type 2).

**GOD-** Glucosa oxidasa.

**GPRC-** Receptores acoplados a proteínas G, (de G Protein Coupled Receptors).

**GSK3β-** Glucógeno sintasa quinasa 3 beta, (de Glycogen Synthase kinase 3 β).

**GSK3β-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína GSK3β, (de Glycogen Synthase kinase 3 β).

**GTP-** Guanosín tri-fosfato, (de guanosine triphosphate).

**Gusb-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Gusb, (de Glucuronidase, beta).

## H

**hMLH1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína hMLH1, (de MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (*E. coli*)).

**hMSH2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína hMSH2, (de MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (*E. coli*)).

**hMSH6-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína hMSH6, (de MutS homolog 6 (*E. coli*)).

**Hprt-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Hprt, (de Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase).

**Hsp90ab1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína de choque térmico de 90 kDa, (de Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1).

**I**

**IL-6-** Interleuquina 6, (de interleukin 6).

**J**

**Jun-** Proto-oncogen *Jun*, (de Jun oncogene).

**K**

**K-RAS-** Símbolo oficial del gen v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

**Kremen1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Kremen, (de Kringle containing transmembrane protein 1).

**L**

**LEF/TCF-** Factor de transcripción LEF/TCF, (de Lymphocyte enhancer factor-1/ T-Cell Factor).

**Lef1-** Símbolo oficial del gen que codifica el factor de unión Lef 1, (de Lymphoid enhancer binding factor 1).

**Lg-** *Lactobacillus gasseri*. .

**LRP-** Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, (de Low density lipoprotein receptor Related Proteins).

**Lrp5-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Lrp5, (de Low density lipoprotein receptor-related protein 5).

**Lrp6-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Lrp6, (de Low density lipoprotein receptor-related protein 6).

**M**

**MMP-7-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína metaloproteínasa 7, (de Matrix metallopeptidase 7).

**Mutación Min-** Multiple intestinal neoplasia.

**N**

**Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> ATPasa-** Bomba sodio potasio.

**NFAT-** Factor nuclear de células T activas, (de Nuclear factor of activated T-cells).

**Nkd-** Proteína Nkd, (de Naked cuticle homolog (*Drosophila*)). .

**Nkd1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína *Naked1*, (de Naked cuticle 1 homolog (*Drosophila*)).

**Nlk-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Nlk, (de Nemo like kinase).

**O**

**OMS-** Organización Mundial de la Salud.

**P**

**PAF-** Poliposis adenomatosa familiar.

**PCP-** Vía de polaridad celular planar, (de planar cell polarity).

**PEPT-1-** Transportador de péptidos PEPT-1, (de Peptide transporter 1, solute carrier family 15 member 1).

**Pitx2-** Símbolo oficial del gen que codifica el factor de transcripción del homeodominio 2, también conocido como pituitaria homeobox 2, (de Paired-like homeodomain transcription factor 2 / pituitary homeobox 2).

**PMS2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína PMS", (de postmeiotic segregation increased 2).

**Porcn-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Porcn, (de Porcupine homolog (*Drosophila*)).

**Ppp2ca-** Símbolo oficial del gen que codifica la subunidad catalítica de la isoforma alfa de la proteína fosfatasa 2, (de Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoforma).

**Ppp2r1a-** Símbolo oficial del gen que codifica la subunidad reguladora de la isoforma alfa de la proteína fosfatasa 2, (de Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoforma).

**PPP2r5d-** Símbolo oficial del gen que codifica la subunidad reguladora *B* de la isoforma delta de la proteína fosfatasa 2, (de *Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoforma*).

**Pygo1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína pygopus 1, (de *Pygopus 1*).

## R

**REE-** Gasto energético en reposo, (de *Resting Energy Expenditure*).

**Rhou-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Rhou, (de *Ras homolog gene family, member U*).

**RT-qPCR-** PCR cuantitativa a tiempo real, (de *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*).

## S

**Senp2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Senp2, (de *SUMO/sentrin specific peptidase 2*).

**sFRP-** Familia de Proteínas relacionadas con receptores Frizzled, (de *Secreted Frizzled Related Proteins*).

**Sfrp1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína sFRP1, (de *Secreted frizzled-related protein 1*).

**Sfrp2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína sFRP2, (de *Secreted frizzled-related protein 2*).

**Sfrp4-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína sFRP4, (de *Secreted frizzled-related protein 4*).

**SGLT-1-** Cotransportador de sodio y glucosa, (de *sodium-glucose cotransporter 1*).

**Slc9a3r1-** Símbolo oficial del gen que codifica la subunidad reguladora de la isoforma 3 del intercambiador sodio / hidrógeno, (de *Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1*).

**Sox17-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína Sox17, (de *SRY-box containing gene 17*).

## T

**TBS-** Tris Buffer Salino, (de *Tris Buffer Saline*).

**Tcf3-** Símbolo oficial del gen que codifica el factor de transcripción 3, (de *Transcription factor 3*).

**Tcf7-** Símbolo oficial del gen que codifica el factor de transcripción 7, (de *Transcription factor 7, T-cell specific*).

**TGF-β-** Factor de crecimiento transformante beta, (de *Transforming growth factor β*).

**TLE/Groucho-** De *groucho/transducin-like enhancer of split*.

**Tle1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína *Transducin-like enhancer of split 1*.

**Tle2-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína *Transducin-like enhancer of split 2*.

## V

**VMBC-** Vesículas de membrana de borde en cepillo.

## W

**Wif1-** Símbolo oficial del gen que codifica el factor inhibidor Wnt 1, (de *WNT Inhibitor Factor 1*).

**Wisp1-** Símbolo oficial del gen que codifica la proteína inducible de señalización WNT1, (de *WNT1 inducible signaling pathway protein 1*).

**Wnt/Ca<sup>2+</sup>-** Vía de señalización WNT dependiente de calcio.

**Wnt-** Genes que codifican proteínas de la familia *Wingless-related MMTV integration site*.







# Índice general

---



|  |           |
|--|-----------|
| <b>1). INTRODUCCIÓN</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.1. La fisiología del intestino</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1.1. El intestino delgado  | 3         |
| 1.1.2. El intestino grueso   | 8         |
| 1.1.3. La microbiota intestinal  | 14        |
| <b>1.2. Carcinogénesis</b>   | <b>14</b> |
| 1.2.1. El cáncer colorrectal   | 16        |
| 1.2.2. Cáncer colorrectal y anomalías fisiológicas                                   | 19        |
| 1.2.3. Cáncer colorrectal y alteración de la vía WNT                                 | 20        |
| 1.2.4. Modelos animales para el estudio de cáncer colorrectal                        | 22        |
| <b>1.3. Relación dieta y salud</b>   | <b>23</b> |
| 1.3.1. Los compuestos bioactivos alimentarios: la quercetina                         | 25        |
| 1.3.2. Los probióticos   | 27        |
| 1.3.3. Combinación de compuestos bioactivos y probióticos                            | 32        |
| <b>2). OBJETIVOS</b>   | <b>35</b> |
| <b>3). MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.1. Diseño experimental</b>  | <b>43</b> |
| 3.1.1. Modelo animal   | 43        |
| 3.1.2. Estudio experimental  | 43        |
| 3.1.3. Dietas  | 45        |
| 3.1.4. Cronograma  | 47        |
| <b>3.2. Microbiota intestinal</b>  | <b>47</b> |
| <b>3.3. Histología del colon</b>   | <b>49</b> |
| 3.3.1. Recuento de lesiones en la mucosa de colon                                    | 49        |
| 3.3.2. Análisis de cortes histológicos de mucosa de colon                            | 49        |
| <b>3.4. Detección de sangre oculta en heces</b>                                      | <b>50</b> |
| <b>3.5. Metabolismo energético</b>   | <b>51</b> |
| <b>3.6. Actividad intestinal</b>   | <b>52</b> |
| 3.6.1. Obtención de vesículas de borde en cepillo                                    | 53        |
| 3.6.2. Determinación de proteína en vesículas de borde en cepillo                    | 54        |
| 3.6.3. Análisis de la actividad de las enzimas sacarasa y maltasa                    | 55        |
| 3.6.4. Análisis de la actividad de enzimas aminopeptidasa-N y dipeptidilpeptidasa-IV | 56        |
| 3.6.5. Expresión de los transportadores SGLT-1 y PEPT-1                              | 58        |
| <b>3.7. Expresión de genes de la vía de señalización Wnt</b>                         | <b>60</b> |
| 3.7.1. Detección de mRNA por qPCR arrays   | 60        |
| 3.7.2. Detección de $\beta$ -catenina mediante la técnica Western blot               | 62        |
| <b>3.8. Análisis de la metilación de genes</b>                                       | <b>63</b> |
| 3.8.1. Extracción de ADN   | 64        |
| 3.8.2. Tratamiento con bisulfito   | 64        |
| 3.8.3. Diseño de cebadores   | 64        |
| 3.8.4. Análisis de metilación por PCR específica de metilación                       | 65        |
| <b>3.9. Análisis estadístico</b>   | <b>68</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4). RESULTADOS .....</b>   | <b>71</b>  |
| <b>4.1. Efectos a nivel sistémico .....</b>   | <b>73</b>  |
| 4.1.1. Evolución del peso corporal .....  | 73         |
| 4.1.2. Pesos de órganos .....   | 74         |
| 4.1.3. Pesos de los depósitos grasos .....  | 75         |
| 4.1.4. Efectos sobre la microbiota intestinal .....   | 76         |
| 4.1.5. Histología de colon .....  | 78         |
| 4.1.5.1. Recuento de lesiones .....   | 78         |
| 4.1.5.2. Análisis de los cortes histológicos de colon .....   | 80         |
| 4.1.6. Sangrado intestinal .....  | 83         |
| <b>4.2. Cambios metabólicos .....</b>   | <b>85</b>  |
| 4.2.1. Cambios en el metabolismo energético .....   | 85         |
| 4.2.2. Cambios de la actividad enzimática en yeyuno .....   | 87         |
| 4.2.3. Expresión de transportadores de membrana en yeyuno .....   | 89         |
| <b>4.3. Efectos en la vía de señalización Wnt.....</b>  | <b>91</b>  |
| 4.3.1. Efectos sobre la expresión de genes de la vía de señalización WNT .....                            | 91         |
| 4.3.2. Efecto sobre la expresión de $\beta$ -catenina en colon.....                                       | 103        |
| 4.3.3. Efectos sobre los niveles de metilación de genes .....   | 104        |
| <b>5). DISCUSIÓN.....</b>   | <b>107</b> |
| <b>5.1. Efectos de las dietas suplementadas A nivel sistémico.....</b>                                    | <b>109</b> |
| 5.1.1. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo.....   | 109        |
| 5.1.2. Efectos sobre órganos.....   | 110        |
| 5.1.3. Efectos sobre el sangrado intestinal .....   | 111        |
| 5.1.4. Efectos sobre la microbiota intestinal .....   | 112        |
| 5.1.5. Efectos sobre la mucosa colónica.....  | 112        |
| <b>5.2. Efectos de las dietas suplementadas sobre el metabolismo energético .....</b>                     | <b>113</b> |
| 5.2.1. Efectos sobre el gasto energético y el cociente respiratorio .....                                 | 113        |
| 5.2.2. Efectos sobre la actividad enzimática y absorción de nutrientes.....                               | 114        |
| <b>5.3. Efectos de las dietas suplementadas sobre la expresión de genes implicados en la vía wnt.....</b> | <b>116</b> |
| <b>6). CONCLUSIONES .....</b>   | <b>125</b> |
| <b>7). BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>131</b> |
| <b>7.1. Referencias bibliográficas .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>8). ANEXOS .....</b>   | <b>147</b> |
| <b>8.1. Anexo I.....</b>  | <b>149</b> |
| <b>8.2. Anexo II .....</b>  | <b>150</b> |
| 8.2.1. Obtención de ADN control para la PCR específica de metilación .....                                | 150        |
| 8.2.2. Clonado de los productos de PCR .....  | 152        |
| 8.2.3. Transformación .....   | 152        |
| 8.2.4. Amplificación de colonias .....  | 153        |
| 8.2.5. Extracción de plásmidos y análisis de su estructura .....  | 153        |





# 1). Introducción

---





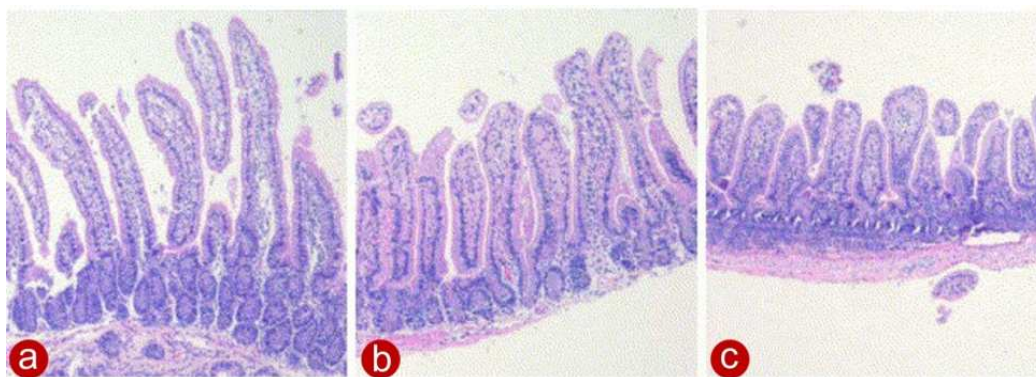
## 1.1. LA FISIOLÓGÍA DEL INTESTINO

Desde el punto de vista anatómico y funcional, el aparato digestivo se divide en el tracto gastrointestinal y en estructuras accesorias de la digestión. En su conjunto, las funciones del aparato digestivo están orientadas a la nutrición del organismo, comprendiendo una serie de fenómenos motores, secretores y de absorción que tienen lugar desde el momento de la ingesta del alimento, hasta la eliminación final de los residuos no útiles para el organismo. Por otra parte es un sistema implicado en la inmunidad del organismo. Cualquier alteración del sistema gastrointestinal tiene repercusión en la homeostasis del cuerpo.

### 1.1.1. El intestino delgado

El intestino delgado constituye el tramo de mayor longitud del tracto gastrointestinal, extendiéndose desde el esfínter pilórico del estómago hasta la válvula ileocecal que se abre al intestino grueso. Las principales funciones del intestino delgado son el transporte, la digestión y la absorción de los nutrientes, además de las funciones inmunológicas. En el intestino delgado se diferencian tres regiones: duodeno, yeyuno e íleon. En las dos primeras regiones se absorben principalmente glúcidos, lípidos, aminoácidos, calcio y hierro, mientras que en el íleon se absorben principalmente las sales biliares, vitamina B<sub>12</sub>, agua y electrolitos <sup>1</sup>.

La estructura de la pared del intestino delgado se compone de mucosa, muscular de la mucosa, submucosa, muscular externa y serosa. Uno de los aspectos diferenciadores del intestino delgado es la existencia de un alto grado de plegamiento, que provoca un incremento de la superficie de absorción, mediante vellosidades (pliegues microscópicos de la mucosa intestinal) y microvellosidades (plegamientos de la membrana celular apical de las células epiteliales <sup>2</sup>). Entre las vellosidades se encuentran localizadas las criptas intestinales o criptas de Lieberkühn (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Diferencias histológicas del intestino delgado: duodeno (a), yeyuno (b) e íleon (c). Se aprecian las vellosidades y las criptas intestinales (imagen tomada de y Kim cols) <sup>3</sup>.



### 1.1.1.2. La absorción de macronutrientes

Como se ha comentado anteriormente, una de las funciones principales del intestino delgado es la absorción de nutrientes. Este proceso se lleva a cabo a través de la membrana apical de las células absortivas. En dicha membrana se encuentran ancladas diferentes enzimas hidrolasas, como la sacarasa-isomaltasa, la maltasa, la lactasa, la aminopeptidasa N, la dipeptidilpeptidasa IV y la fosfatasa alcalina. Las enzimas intestinales juegan un papel destacado en la digestión y absorción de carbohidratos y proteínas.

#### *a. Absorción de glúcidos*

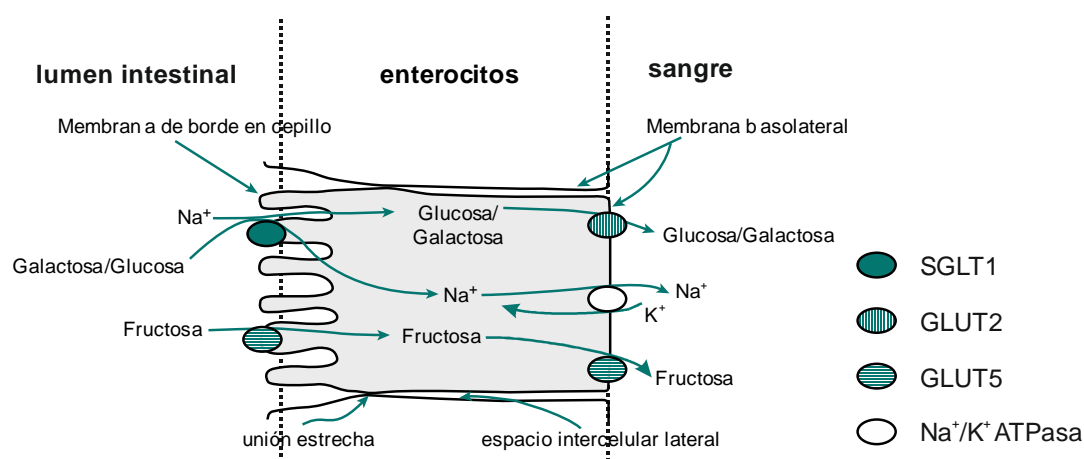
El almidón y el glucógeno son los únicos carbohidratos complejos digeribles. Estos compuestos son digeridos a lo largo del tracto gastrointestinal por acción de la amilasa, que fragmenta las largas cadenas de glucosa dando lugar a moléculas más pequeñas; oligosacáridos o disacáridos de glucosa (maltosa). Estas moléculas, a pesar de tener un tamaño relativamente pequeño, no pueden ser absorbidas directamente, ya que los transportadores presentes en la membrana apical de los enterocitos únicamente transportan monosacáridos. Es por ello que los disacáridos de la dieta son nuevamente hidrolizados por acción de las disacaridasas ancladas en el borde en cepillo intestinal (sacarasa, maltasa y lactasa), dando lugar a monosacáridos. Las enzimas disacaridasas más importantes en la edad adulta son la sacarasa y la maltasa. La sacarasa hidroliza el disacárido sacarosa, dando lugar a los monosacáridos fructosa y glucosa. En el caso de la maltasa, el disacárido sobre el que actúa es la maltosa, produciendo dos moléculas de glucosa.

La glucosa representa el 80% de los monosacáridos obtenidos de la digestión de los carbohidratos de la dieta, y su transporte es un evento fundamental en el metabolismo de los mamíferos. Además, este monosacárido tiene un papel central en el metabolismo y la homeostasis celular <sup>6</sup>. El transporte de la glucosa y de galactosa a través de la membrana celular se produce a través de dos familias de transportadores de membrana: transportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT).

Los transportadores de glucosa SGLT-1, SGLT-2 y SGLT-3 se encuentran localizados en epitelios de absorción (epitelio del intestino delgado) y de reabsorción de nutrientes (epitelio tubular renal). Además otros transportadores de esta familia están relacionados con la absorción de inositol (SGLT-4), de yodo (SGLT-5) y de multivitaminas (SGLT-6) <sup>7</sup>. La absorción de glucosa a nivel intestinal se realiza en contra de gradiente de concentración mediante el transportador asociado a sodio ( $\text{Na}^+$ ) SGLT-1. La entrada del ión  $\text{Na}^+$  al interior celular a favor de gradiente proporciona la fuerza motriz que permite la entrada de glucosa al interior celular. Por tanto la actividad de SGLT-1 precisa del mantenimiento del gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$ . La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, es la encargada de mantener dicho gradiente, bombeando  $\text{Na}^+$  a través de la

membrana basolateral del enterocito <sup>7</sup>. La acción del transportador SGLT-1, puede ser modificada por varios factores, entre los que destaca la concentración de monosacáridos en el lumen intestinal <sup>8</sup>, además de verse afectado en condiciones patológicas <sup>9</sup>.

En los enterocitos, existen otros transportadores de monosacáridos además de SGLT-1. La absorción de fructosa se produce a favor de gradiente, a través del transportador GLUT-5 localizado en la membrana apical <sup>7</sup>. En la parte basal de la célula se encuentran localizados los transportadores GLUT-2 y GLUT-5, que permiten la salida a favor de gradiente de glucosa/galactosa y de fructosa respectivamente. En la Figura 1.3 se muestra la localización de los transportadores asociados al transporte de monosacáridos en las células del epitelio intestinal.

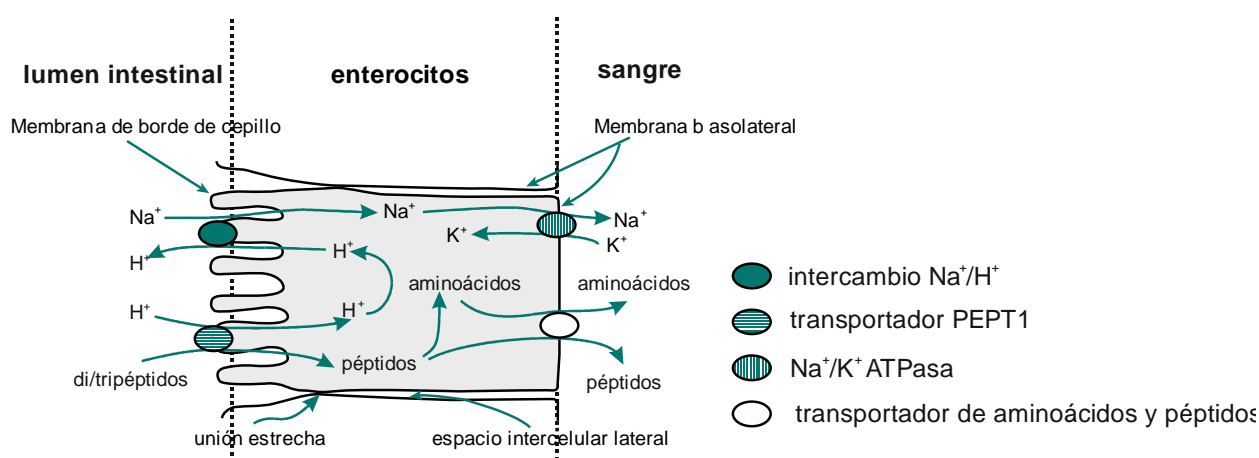


**Figura 1.3.** Modelo de transporte de azúcares a través de los enterocitos. La glucosa y la galactosa que alcanzan la luz intestinal se incorporan al enterocito por medio del cotransportador primario SGLT1, mientras que la fructosa lo hace pasivamente por el transportador GLUT5 (modificado de Wright y cols) <sup>9</sup>.

#### b. Absorción de aminoácidos

Las proteínas de la dieta son digeridas a lo largo del tracto gastrointestinal por acción de dos grupos de enzimas, las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las endopeptidasas fragmentan los péptidos dando lugar a péptidos de menor tamaño, mientras que las exopeptidasas fragmentan los péptidos dando lugar a aminoácidos. La digestión comienza en el estómago por acción de las pepsinas, además, las condiciones ácidas del estómago contribuyen a la hidrólisis. En el intestino continúa la digestión de proteínas por acción de las endopeptidasas pancreáticas, fundamentalmente tripsina, elastasa, quimiotripsina, así como las exopeptidasas como carboxipeptidasa A y B <sup>10</sup>. Además, en el borde en cepillo de los enterocitos se encuentran ancladas otras peptidasas, entre las que destacan la aminopeptidasa N (APN) y la dipeptidilpeptidasa IV (DPP-IV). <sup>6</sup>

Como en el caso de los monosacáridos, la absorción de aminoácidos se produce preferentemente en el intestino delgado, especialmente en el duodeno y en el yeyuno. Dicha absorción, puede producirse por difusión pasiva a favor de gradiente, por vía paracelular (a través de las uniones intercelulares) y por endocitosis. Estos mecanismos implican el movimiento de péptidos de bajo peso molecular sin gasto de energía y sin sistema de transporte específico. Sin embargo, el principal mecanismo de absorción de aminoácidos es la captación de péptidos a través de la membrana apical de los enterocitos por medio del transportador PEPT-1. A diferencia de otros transportadores, el transportador PEPT-1 presenta una gran variedad de substratos, incluyendo 400 dipéptidos y 8.000 tripéptidos que pueden producirse como consecuencia de la digestión de las proteínas<sup>11</sup>. La captación de los péptidos se encuentra asociada a la entrada del ión  $H^+$  al interior celular a favor de gradiente, que proporciona la fuerza motriz que permite a su vez la entrada de los péptidos al interior celular. Por tanto, es necesaria la existencia de mecanismos que permitan mantener el gradiente electroquímico (bomba  $Na^+/H^+$ ), así como el aporte energético ( $Na^+/K^+$  ATPasa). En la Figura 1.4 se muestran los procesos involucrados en el proceso de absorción de péptidos a través del transportador PEPT-1.



**Figura 1.4.** Modelo de transporte intestinal de los péptidos procedentes de la dieta a través de ruta principal. Los di y tripéptidos se absorben por medio del transportador PEPT1 (modificado a partir de Gilbert y cols)<sup>12</sup>.

Cabe destacar que la expresión del transportador PEPT-1 puede verse modificada en determinadas patologías como diabetes, trasplante intestinal y enfermedades intestinales inflamatorias. Por ejemplo, en el caso de colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, se ha observado un incremento de la expresión de PEPT-1 <sup>11</sup>.

### 1.1.2. El intestino grueso

El colon o intestino grueso representa el último tramo del tracto digestivo, extendiéndose desde la válvula ileocecal hasta el ano. El colon posee una escasa función digestiva, ya que los principales nutrientes se han absorbido previamente en el intestino delgado, sin embargo, sí tiene un papel destacado en la absorción de agua, electrolitos, y determinadas vitaminas del complejo B y vitamina K. En la última región del colon se almacena y compacta la materia de desecho hasta su posterior eliminación.

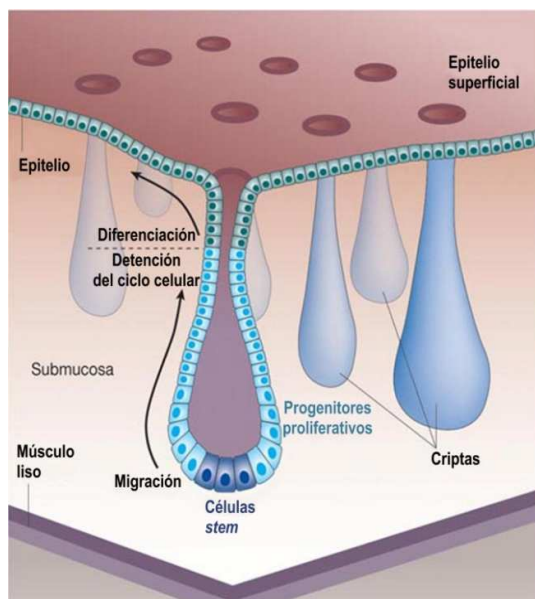
#### 1.1.2.1. Epitelio colónico: estructura

La pared del colon está formada por las capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa, siendo un tejido ampliamente irrigado por vasos sanguíneos y linfáticos. El epitelio de la mucosa de colon es un epitelio simple, cilíndrico, que forma un gran número de invaginaciones hacia el interior de la lámina propia, denominadas criptas de Lieberkühn. A diferencia del intestino delgado, la mucosa de colon tiene un aspecto plano debido a la ausencia de vellosidades. Al igual que en el intestino delgado, las células más abundantes son las absortivas y las caliciformes, sin embargo presenta menor número de células enteroendocrinas y ausencia de células de Paneth. En el fondo de las criptas se localizan las células madre indiferenciadas o células *stem* <sup>13</sup>.

#### 1.1.2.2. Epitelio colónico: desarrollo

El epitelio intestinal se renueva cada 4-5 días por migración celular desde la parte basal de la cripta hacia la parte apical. Es necesario que se mantenga un balance entre la proliferación celular y la eliminación o pérdida de células en la parte apical de la cripta intestinal. En la parte basal de la cripta se localiza el compartimento proliferativo, formado por las células madre indiferenciadas, siendo en esta región de la cripta donde se produce la proliferación celular <sup>14</sup>. Durante la migración celular a lo largo del eje basal-apical, las células pasan de un fenotipo proliferativo a un fenotipo diferenciado. La diferenciación celular (Figura 1.5) se produce como consecuencia de la activación de los programas génicos propios de cada uno de los tipos celulares presentes en el epitelio colónico <sup>15,16</sup>. Diversos estudios han mostrado la importancia de la vía de señalización WNT en los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio colónico, tanto en condiciones normales como durante la carcinogénesis colorrectal <sup>17-19</sup>.



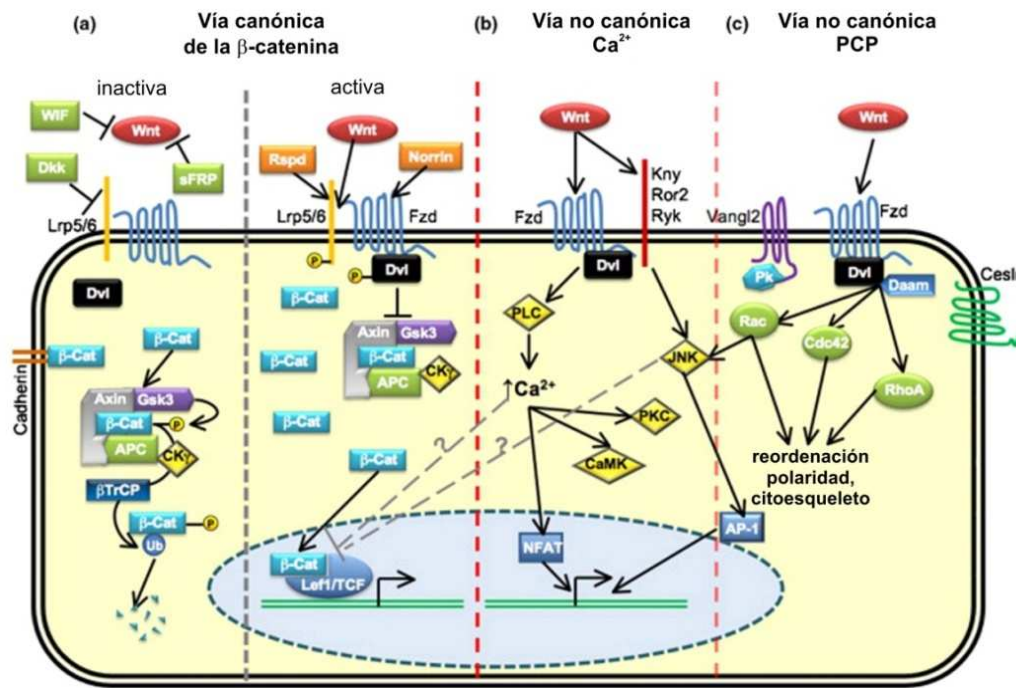


**Figura 1.5.** Representación esquemática de los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular en las criptas intestinales. (tomada de Reya y Clevers)<sup>20</sup>.

a. *La vía de señalización WNT*

La vía de señalización WNT toma su nombre de los ligandos extracelulares que provocan su activación. La denominación WNT proviene del oncogén *wingless-type mmtc integration type site (Wnt-1)*<sup>21</sup>, llamado así por su homología con el gen *wingless (WG)* de *Drosophila melanogaster*<sup>22</sup>. Posteriormente se descubrió en ratón una nueva serie de genes con similitudes con *Wnt-1*, por lo que se fueron denominados genéricamente *Wnt* y se numeraron correlativamente según se fueron descubriendo. En la vía de señalización WNT (Figura 1.6) se distinguen tres vías, la vía canónica, la vía de polaridad celular planar (PCP) y la vía WNT dependiente de calcio (*Wnt/Ca<sup>2+</sup>*).

La vía canónica está involucrada en el control de la proliferación celular. La vía de polaridad celular planar (PCP) regula los procesos de reordenación del citoesqueleto, desempeñando una función destacada en la formación de la polaridad celular y la migración. La vía dependiente de calcio (*Wnt/Ca<sup>2+</sup>*) modula la vía canónica, actuando como inhibidor de la misma. La vía WNT actúa en la regulación del desarrollo embrionario, así como en los procesos de renovación de numerosos tejidos en adultos, incluido el epitelio colónico.



**Figura 1.6.** Esquema de las tres formas de la vías de señalización WNT, en el que se muestra sus principales componentes (según Franco y cols.)<sup>23</sup>.

*b. La vía WNT canónica: componentes*

Los ligandos de la vía WNT son polipéptidos de unos 40 kDa que en condiciones normales son secretados por las células mesenquimales o epiteliales localizadas en la parte inferior de la cripta. Estos ligandos son los responsables del mantenimiento de la capacidad proliferativa de las células madre indiferenciadas de las criptas intestinales. La unión de los ligandos Wnt a receptores de la membrana Frizzled provoca la activación de la vía. La acción de los ligandos Wnt puede ser bloqueada por la acción del inhibidor WIF1 (*WNT Inhibitor Factor 1*), una proteína hidrosoluble capaz de unirse a los ligandos Wnt reprimiendo su actividad. Se ha descrito que el gen WIF1 se encuentra silenciado en algunos tipos de tumores gastrointestinales, entre ellos el cáncer colorrectal<sup>24,25</sup>.

Los receptores transmembrana de la familia Frizzled son los primeros receptores implicados en la vía WNT que se describieron. Estos receptores se unen a ligandos Wnt, provocando la activación de la vía. Los receptores Frizzled se consideran receptores acoplados a proteínas G (*G protein Coupled Receptors* o GPCR)<sup>26</sup>. El heterodímero de las proteínas G está formado por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , donde la subunidad  $\alpha$  se encuentra unida a GDP y permanece anclada al dímero  $\beta\gamma$ . La unión de ligandos a los receptores Frizzled acoplados a GPCR provoca un cambio de conformación que permite el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$ , liberándose la subunidad  $G\alpha$  ( $G\alpha$ -GTP), que es la forma activa. Se ha propuesto que  $G\alpha$  produce la activación de la vía mediante interacción física con axina, provocando la desestabilización del complejo de



degradación de  $\beta$ -catenina<sup>27</sup>. A pesar de que la conversión de Go-GDP a Go-GTP es un evento esencial en la activación de la vía de señalización, no se puede asegurar que Go sea el único transductor involucrado en la vía de señalización WNT<sup>28</sup>. La activación de Go provoca además, la liberación del dímero  $\beta\gamma$ , el cual actúa sobre *Dvl*, favoreciendo también una regulación positiva de la vía canónica WNT<sup>27</sup>. La unión de los ligandos Wnt a los receptores Frizzled puede ser bloqueada por las proteínas de la familia sFRP (*secreted Frizzled Related Proteins*). Estas proteínas se caracterizan por ser solubles, y tener una gran similitud con los ligandos Wnt, por lo que pueden competir con ellos por la unión a receptores Frizzled. Las sFRP actúan como inhibidores de la vía canónica WNT<sup>29</sup>.

Los receptores de la familia Frizzled no son los únicos involucrados en la activación de la vía canónica WNT. Además son necesarios otros correceptores, los *LRP* (*Low density lipoprotein receptor Related Proteins*). En vertebrados se han identificado dos correceptores de este tipo, LRP5 y LRP6. A pesar de que se ha comprobado que estos receptores son necesarios para la activación de la vía WNT<sup>30</sup>, su mecanismo de acción no está completamente descrito. Las proteínas Kremen y Dkk (*Dickkopf*) inhiben la activación de la vía canónica WNT formando un heterodímero con LRP6, lo que provoca la endocitosis de éste último<sup>31</sup>.

El siguiente punto de control en la cascada de activación se encuentra a nivel de las proteínas Dishevelled (DVL o Dsh). Estas proteínas están involucradas en la diversificación de la vía WNT en sus tres vías, vía canónica, vía PCP (*Planar Cell Polarity*) y vía WNT-Ca<sup>2+</sup><sup>32</sup>. Se ha propuesto que la unión de DVL con el receptor Frizzled permite su unión a axina, unión que inhibe la formación del complejo de degradación de la proteína  $\beta$ -catenina, activando por tanto la vía canónica<sup>33</sup>.

El punto de regulación más importante de la vía WNT se encuentra a nivel del complejo de degradación de la proteína  $\beta$ -catenina, la cual se encuentra expresada de forma constitutiva en el citoplasma de la célula. En condiciones basales (en ausencia de señales Wnt)  $\beta$ -catenina es degradada de forma constitutiva, evitándose de esta forma su acumulación en el citoplasma. Sin embargo, para que se produzca la degradación de  $\beta$ -catenina por ubiquitinación, es necesario que la proteína haya sido fosforilada previamente. Las proteínas implicadas en el proceso de fosforilación de  $\beta$ -catenina son las quinasas GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase kinase  $\beta$* ) y CKI $\alpha$  (*Casein Kinase 1 $\alpha$* ), cuya acción precisa de la formación del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina (GSK3 $\beta$ , CKI $\alpha$ , axina, APC y  $\beta$ -catenina). A su vez, la formación del complejo de degradación precisa de la fosforilación de axina, que es la encargada de anclar al resto de las proteínas que forman el complejo. GSK3 $\beta$  es la responsable de fosforilar a axina y por tanto favorece la formación del complejo<sup>34</sup>. Además de actuar sobre axina, GSK3 $\beta$  es la responsable de la fosforilación de  $\beta$ -catenina, marcándola para su posterior degradación. La activación de la vía WNT inhibe a GSK3 $\beta$  por fosforilación, bloqueándose tanto la formación del complejo de degradación como la

fosforilación de  $\beta$ -catenina. Se ha propuesto que la fosforilación de GSK3 $\beta$  se produce por la acción de la serina/treonina quinasa Akt, cuya actividad está inducida por DVL<sup>34,35</sup>. Asimismo, diferentes formas de PKC también tendrían capacidad de fosforilar e inactivar a GSK3 $\beta$ . La serina/treonina fosfatasa PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) puede revertir la fosforilación de GSK3 $\beta$ , revirtiendo la inhibición inducida por la estimulación de la vía canónica WNT<sup>36</sup>.

APC es uno de los principales reguladores negativos de la vía canónica WNT. Forma parte del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, permitiendo la fosforilación de  $\beta$ -catenina. Además de su función reguladora de los niveles de  $\beta$ -catenina a nivel citoplasmático, se ha propuesto que la localización de APC en el núcleo celular puede favorecer la translocación de  $\beta$ -catenina desde el núcleo celular al citoplasma, impidiendo de esta forma la acción de  $\beta$ -catenina como co-activador transcripcional<sup>14</sup>.

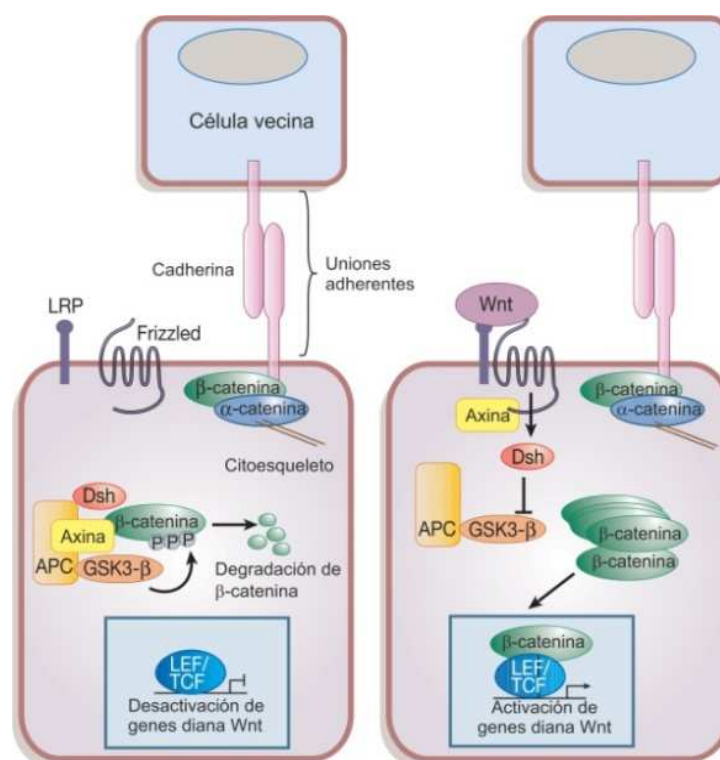
La regulación de  $\beta$ -catenina a nivel citoplasmático es fundamental para el control de la proliferación, puesto que la acumulación de esta proteína en el citoplasma facilita su translocación al núcleo celular. En el núcleo,  $\beta$ -catenina se une a factores transcripcionales LEF/TCF (*Lymphocyte enhancer factor-1/ T-Cell Factor*), dando lugar a la transcripción de genes implicados en la proliferación celular, como son *ciclina D1*, *c-MYC* y *MMP-7*.

A nivel del núcleo celular también existen diversos mecanismos de regulación. Por una parte, CBP/p300 pueden interaccionar con  $\beta$ -catenina incrementando la actividad transcripcional del complejo  $\beta$ -catenina/TCF<sup>37</sup>. Como co-represores de la acción de  $\beta$ -catenina, cabe destacar las proteínas de la familia TLE/Groucho (como TLE1, TLE2 y TLE3) (*Transducin-like Enhancer of Split*) las cuales actúan como represores de la acción de LEF/TCF<sup>38</sup>.

### c. La vía WNT no canónica: componentes

Como se ha señalado anteriormente, la vía canónica WNT consta de dos alternativas más, PCP y WNT-Ca<sup>2+</sup>. La vía PCP se encuentra relacionada con la reorganización del citoesqueleto, la migración celular y la polarización de las células. En esta vía, además de los receptores Frizzled, actúan las proteínas Rho y JNK (*Jun-N-Terminal Kinase*). La regulación de las diferentes vías, se produce a nivel de la unión ligando-receptor, puesto que diferentes ligandos Wnt provocan la activación de una u otra vía de forma indiferente. En este sentido, hay que destacar que la fosforilación de la proteína DVL juega un papel esencial en la regulación de la activación de la vía canónica y PCP. Se cree que CKI produce la fosforilación de DVL, la cual favorece la activación de la vía canónica en detrimento de la vía PCP. La proteína Nkd (*Naked*) es capaz de unirse a DVL, provocando la inactivación de la vía canónica e induciendo la activación de la vía PCP<sup>39</sup>.

Por su parte, la vía WNT- $\text{Ca}^{2+}$  actúa como antagonista de la vía canónica, produciendo la regulación negativa de la misma. Se ha propuesto que la vía WNT  $\text{Ca}^{2+}$  modula a la vía canónica a través de la familia de proteínas NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), que actúan como desestabilizadores del complejo  $\beta$ -catenina-LEF1/TCF, actuando como represores de la transcripción<sup>40</sup>.



**Figura 1.7.** Esquema de la vía canónica de señalización WNT en la proliferación celular: a la izquierda en ausencia de señal Wnt y a la derecha en presencia de señal Wnt tomado de Reya y Clevers<sup>20</sup>.

### 1.1.2.3. Epitelio colónico: proliferación

En condiciones normales, se sugiere que las células mesenquimales, localizadas debajo de la cripta, son las encargadas de mantener el potencial proliferativo de las células madre indiferenciadas, mediante la producción de ligandos Wnt. Dichos ligandos activan la vía canónica WNT mediante su unión a los receptores de membrana Frizzled, unión que produce la fosforilación de la proteína *disevelled* (DVL). La proteína DVL fosforilada interacciona con la proteína actina, bloqueando la formación del complejo Apc-axina-GSK-3 $\beta$ . En estas condiciones se bloquea la acción de la proteína GSK-3 $\beta$  y como consecuencia, se produce la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina, favoreciéndose su translocación al núcleo. En el núcleo celular  $\beta$ -catenina actúa como co-activador transcripcional de genes implicados en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado

mediante la unión a proteínas de la familia TCF/LEF (Figura 1.7). Los principales genes diana de  $\beta$ -catenina son *ciclina D1*, *c-MYC* y *MMP-7* (*Matrix Metalloproteinase 7*).

A medida que las células ascienden por la cripta, cesan las señales extracelulares Wnt, lo que permite la formación del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina. La formación de dicho complejo permite la fosforilación de  $\beta$ -catenina, induciendo su posterior degradación por ubiquitinación (Figura 1.6). A nivel fisiológico, estos cambios se traducen en la inhibición de la proliferación celular y el inicio de la diferenciación<sup>14,41</sup>.

### 1.1.3. La microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal de mamíferos se encuentra colonizado por una microbiota compleja formada por más de 400 especies de bacterias. La mayor parte de esta microbiota intestinal habita en el colon. En los mamíferos, la colonización del tracto digestivo se produce inmediatamente después del nacimiento<sup>42</sup>, a partir de la flora vaginal y fecal de la madre, siendo más rápida en el caso de parto vía vaginal que por cesárea. Tras el nacimiento, el neonato sigue adquiriendo microorganismos presentes en el entorno, así como de las personas con las que tiene contacto físico<sup>43</sup>. Del mismo modo, la leche materna ayuda a la colonización del tracto gastrointestinal. Se calcula que la leche materna contiene una flora de  $10^9$  ufc/L, en la que están presentes estafilococos, estreptococos, corynebacterias, lactobacilos, micrococos, propionibacterias y bifidobacterias. Estos microorganismos provienen de los conductos galactóforos de la mama y del pezón de la madre.

La microbiota intestinal ejerce multitud de efectos sobre la fisiología intestinal del hospedador. Por una parte actúa sobre las moléculas indigeribles del quimo produciendo ácidos grasos de cadena corta<sup>44</sup>, los cuales, además de servir como nutrientes de las células epiteliales, colaboran en la absorción de sodio, bicarbonato, calcio, magnesio y hierro<sup>2</sup>. La microbiota intestinal también produce vitamina K y ácido fólico que son absorbidos por el colon. Pero los efectos de la microbiota intestinal van más allá de los efectos meramente nutricionales, regulan la maduración del tracto gastrointestinal, la resistencia a patógenos, la proliferación intestinal y la respuesta inflamatoria<sup>44-46</sup>. Se ha observado que diversas patologías del tracto digestivo provocan alteraciones en el equilibrio de la microbiota intestinal. En este sentido cabe destacar que tanto el mantenimiento como la restauración de una microbiota intestinal adecuada tiene efecto preventivo frente al desarrollo de diversas enfermedades, como alergias, obesidad y especialmente enfermedades asociadas con inflamación del tracto digestivo, como la enfermedad de Crohn y el cáncer<sup>47-50</sup>.

## 1.2. CARCINOGENESIS

En la actualidad el cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública, especialmente en los países desarrollados. A pesar de que se trata de una enfermedad que se puede desarrollar a cualquier edad, es más frecuente en edades avanzadas, por ello es una enfermedad que se considera asociada a la edad. La edad media a la que se diagnostica el cáncer está situada alrededor de los 67 años, siendo el 76% de los casos de cáncer diagnosticado por encima de los 55 años de edad.

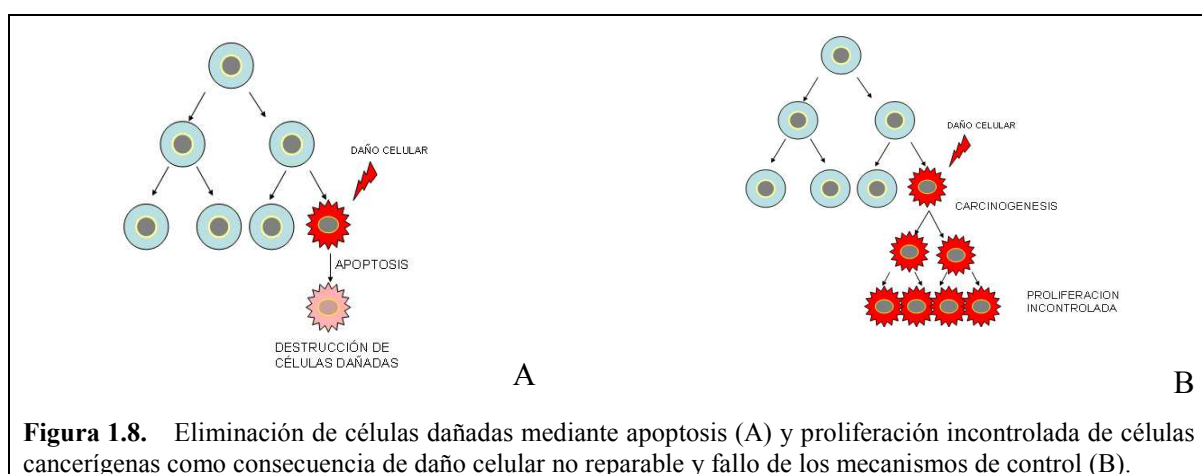
A pesar de que se emplea genéricamente el término de cáncer, hay que tener en cuenta que esté concepto engloba a un grupo heterogéneo de enfermedades. Son enfermedades diferentes desde el punto de vista de su localización, de la causa que la origina, de su evolución, por sus características fenotípicas y también desde el punto de vista del tratamiento médico. Sin embargo, a pesar de las múltiples diferencias que presentan, comparten una serie de características importantes a nivel molecular que hace que se hayan agrupado todas ellas bajo el término de cáncer. Casi todos los tipos de cáncer tienen su origen en la alteración genética producida en una única célula <sup>51</sup>.

La carcinogénesis es un proceso multifactorial, en el cual, una célula sufre una serie de transformaciones que la convierten en célula tumoral, y en función de las transformaciones que sufre puede alcanzar malignidad. Estas posibles transformaciones son;

- Potencial replicativo ilimitado, unido a alta tasa proliferativa.
- Independencia de señales antiproliferativas.
- Evasión de la apoptosis.
- Capacidad de inducir angiogénesis.
- Capacidad de invadir otros órganos.

El proceso de iniciación de la carcinogénesis puede ser resultado de eventos endógenos, como errores en la replicación del ADN, la inestabilidad intrínseca de ciertas bases del ADN o el ataque de radicales libres, generados durante el metabolismo celular. También puede ser resultado de procesos exógenos de tipo físico o químico <sup>52</sup> (radiaciones ionizantes, aminos heterocíclicos, etc).

En condiciones normales, las células que han sufrido daño o alteraciones en su ADN se inducen a entrar en apoptosis con el fin de ser eliminadas. Como se ha comentado anteriormente, durante el proceso de carcinogénesis algunas células pueden escapar de las señales de apoptosis, perpetuando la alteración genética en la célula original y también en las células descendientes (Figura 1.8). Estas células presentan una mayor proliferación celular que las células normales, dando lugar a la formación de nódulos o tumores. Los tumores con capacidad de invadir tejidos o incluso órganos distantes (metástasis) son considerados tumores malignos.



Los diferentes tipos de cáncer se clasifican en función del tejido y del tipo celular a partir del que se originan. De esta forma se denomina carcinoma a aquellos cánceres provenientes de células epiteliales y sarcomas a los originados en tejido conjuntivo y músculo. Las leucemias y los cánceres derivados de células nerviosas se clasifican de forma independiente, al no ajustarse a esta clasificación <sup>51</sup>.

### 1.2.1. El cáncer colorrectal

El término cáncer colorrectal (CCR) hace referencia a un adenocarcinoma localizado en el colon o recto, que es el principal tipo de tumor que se produce en estas localizaciones, aunque no es el único. Otros tumores, o tienen una incidencia muy baja o son tumores secundarios debidos a metástasis de otros tipos de cáncer, como el de mama y el de pulmón.

A nivel mundial, el CCR representa el tercer tipo de cáncer más frecuente en los hombres (tras el cáncer de pulmón y próstata), y el segundo en las mujeres (tras el cáncer de mama). Aproximadamente cada año se diagnostican en el mundo un millón de nuevos casos<sup>53</sup>, suponiendo el 9,5% de todos los cánceres. Se aprecia una mayor incidencia de la enfermedad en hombres que en mujeres. Además este tipo de tumor presenta diferencias geográficas, siendo más frecuente en países desarrollados<sup>54</sup>. En España, la incidencia se considera alta en ambos sexos (tasa anual en el año 2008 fue de 39,7 nuevos casos por cada 100.000 habitantes en hombres, y de 22,9 nuevos casos por cada 100.000 habitantes en mujeres)<sup>55</sup> y su tendencia es a aumentar, con más celeridad en el sexo masculino<sup>54</sup>. Agrupando los datos de ambos sexos, el CCR es el cáncer con mayor incidencia<sup>56</sup>.

Los factores de riesgo que predisponen a sufrir CCR son:

- La edad: el 90% de los casos de CCR se diagnostican superados los 50 años, siendo muy baja la incidencia de la enfermedad a edades inferiores a los 40 años.
- Los hábitos de vida: el consumo de alcohol, de tabaco, la falta de ejercicio físico y especialmente las dietas ricas en carne y grasas saturadas incrementan el riesgo de sufrir CCR.
- Presencia de pólipos intestinales; aunque de carácter benigno, los pólipos son formaciones anómalas que se desarrollan en la pared interna del colon y recto. Son lesiones bastante frecuentes en personas de más de 50 años.
- Antecedentes familiares y personales de CCR; los familiares de primer grado de un paciente con CCR presentan mayor riesgo de sufrir la enfermedad. Del mismo modo, personas que han sufrido un CCR tienen mayor riesgo de volver a presentar un nuevo tumor que la población general.
- Enfermedad inflamatoria intestinal; la existencia de algún tipo de enfermedad inflamatoria a nivel intestinal con afectación colónica (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) incrementan el riesgo de desarrollar CCR.
- Síndromes hereditarios; poliposis adenomatosa familiar (*PAF*), síndrome de Lynch, etc.

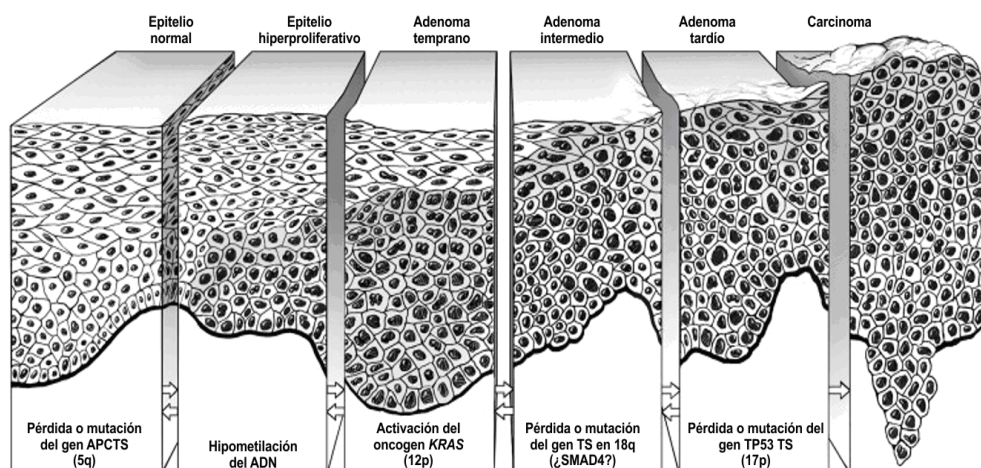
Tradicionalmente los casos de CCR se han clasificado en función de su origen, como CCR hereditario y CCR esporádico. Se estima que solo en el 20% de los casos de cáncer colorrectal existen factores de riesgo de carácter familiar. Los casos de CCR hereditario se clasifican en función de la aparición o no de pólipos.

La *poliposis adenomatosa familiar (PAF)*, es un síndrome de herencia autosómica dominante, consecuencia de mutaciones germinales en el gen supresor *APC (Adenomatous Polyposis Coli)* localizado en el cromosoma 5. Esta mutación provoca la pérdida de funcionalidad de la proteína para la que codifica<sup>19,57</sup>, produciéndose el desarrollo de multitud de pólipos desde la infancia. El desarrollo de pólipos en el colon incrementa el riesgo de padecer CCR y se relaciona principalmente con casos de CCR en edades tempranas, antes de los 45 años.

El CCR hereditario no asociado a poliposis, anteriormente denominado síndrome de Lynch, supone un 3% de los casos de CCR<sup>58</sup>. Se trata de un síndrome de herencia autosómica dominante igual que la *PAF*, pero en este caso el desarrollo de la carcinogénesis se debe a mutaciones hereditarias de genes reparadores del ADN. (*hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* o *PMS2*)<sup>59,60</sup>. Este tipo de cáncer, al igual que en el caso de pacientes con *PAF*, se diagnostica en torno a los 45 años.

El CCR esporádico representa la mayor proporción de casos y en su desarrollo no existe implicación genética hereditaria. Según el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein<sup>61</sup>, el CCR esporádico se produce como consecuencia de una mutación somática en células de la cripta intestinal. Esta primera mutación, por sí misma, no provoca el desarrollo del CCR, sino que da lugar a una lesión preneoplásica en la que es más probable que se produzcan nuevas mutaciones que provoquen el desarrollo del CCR. La incorporación de nuevas mutaciones se correlaciona con los diferentes estadios de la enfermedad, desde lesiones benignas hasta lesiones con carácter invasivo. La lesión más pequeña que se detecta corresponde a los focos de criptas aberrantes (FCA). Estas lesiones, de carácter benigno, se caracterizan por ser criptas intestinales hiperplásicas y/o displásicas. La hiperproliferación de las células mutadas puede dar lugar a pequeños pólipos benignos en la mucosa de colon. En la mayor parte de estas lesiones se observa la mutación de genes supresores de tumores, siendo el gen *APC* el que presenta la mutación con mayor frecuencia<sup>62</sup>. El desarrollo de pólipos no implica necesariamente el posterior desarrollo de adenocarcinomas, pero sí incrementa el riesgo. El paso de pólipo a adenoma se produce como consecuencia de la activación de oncogenes como *K-RAS*, unido al silenciamiento de genes supresores de tumores. Estas mutaciones provocan un incremento de la proliferación y aumentan la malignidad del tumor. Finalmente, nuevas mutaciones en genes como *p53*, provoca el paso de adenoma *in situ* a un adenocarcinoma con capacidad de invadir tejidos adyacentes (Figura 1.9).





**Figura 1.9.** Esquema secuencial de las mutaciones en el desarrollo de cáncer colorrectal esporádico, según el modelo descrito por Fearon y Vogelstein (modificado a partir de Tammariello y cols.<sup>63</sup>).

### 1.2.2. Cáncer colorrectal y anomalías fisiológicas

Asociada al desarrollo de enfermedades neoplásicas es frecuente la aparición de otros signos de enfermedad, concretamente, en el caso de CCR es común la aparición de sangrado intestinal, anemia y caquexia. La caquexia es un síndrome multifactorial, caracterizado por una pérdida importante de peso corporal, producida fundamentalmente por la pérdida de tejido adiposo así como de masa muscular<sup>64,65</sup>. Aunque la pérdida de peso corporal es el factor más visible de la caquexia, este síndrome incluye otras alteraciones fisiológicas como son la anorexia, vómitos, alteraciones de la absorción intestinal, astenia, debilidad, cansancio e inmunodepresión. El desarrollo de caquexia provoca el debilitamiento del organismo, relacionándose directamente con una peor calidad de vida y una menor supervivencia<sup>64,66,67</sup>.

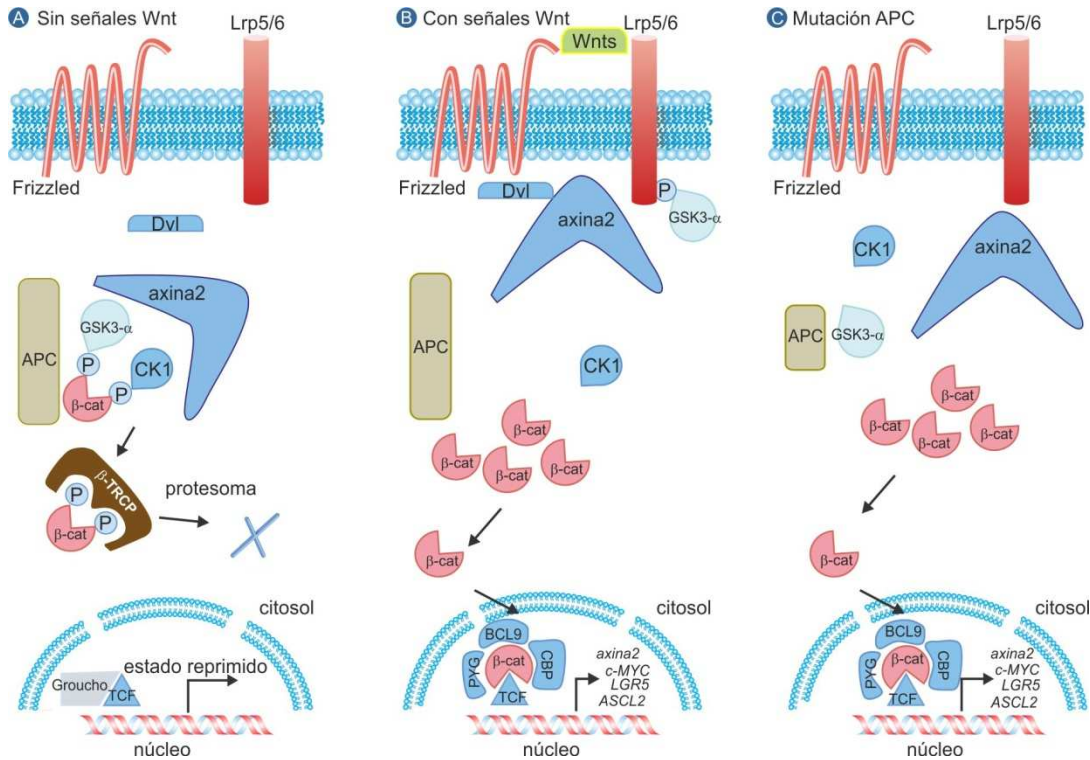
Se cree que el desarrollo de caquexia en enfermedades neoplásicas se ve favorecido por la existencia de alteraciones metabólicas asociadas al propio desarrollo de los tumores. Las células tumorales presentan una mayor demanda de glucosa que las células normales, como consecuencia de una mayor demanda de cadenas carbonadas, condiciones de hipoxia y alteraciones mitocondriales (reducción de  $H^+$ -ATP sintasa (h-F1-ATPase)) que provocan una reducción de la fosforilación oxidativa mitocondrial<sup>68</sup>. En este sentido, el desarrollo de enfermedades tumorales puede provocar el incremento del gasto energético, lo que favorecería el desarrollo de caquexia al provocar un balance energético negativo. Sin embargo, hay que destacar que no todos los tumores provocan los mismos cambios en el metabolismo energético. Se ha descrito que el gasto energético puede verse incrementado, reducido o incluso no estar afectado dependiendo del tipo de tumor.

Además, se ha observado que no solo el tipo de tumor es un factor determinante en el metabolismo energético, sino que el grado de desarrollo de la enfermedad también implica modificaciones en el gasto energético <sup>69,70</sup>.

Al igual que el gasto energético y el metabolismo de glúcidos, el metabolismo lipídico y de proteínas también puede verse afectado como consecuencia del crecimiento tumoral. En pacientes con cáncer es frecuente observar pérdidas de tejido adiposo, provocadas por un incremento de la movilización y oxidación de lípidos<sup>71</sup>. En el caso de la pérdida de tejido muscular, ésta se aprecia en estadios más avanzados de caquexia, manifestándose clínicamente como atrofia. En las fases iniciales de la caquexia no se han observado cambios significativos en el metabolismo proteico, por el contrario, en los estados avanzados se observa una disminución de la síntesis de proteína así como un incremento de la proteólisis muscular, lo cual explicaría la reducción de la masa muscular<sup>72</sup>.

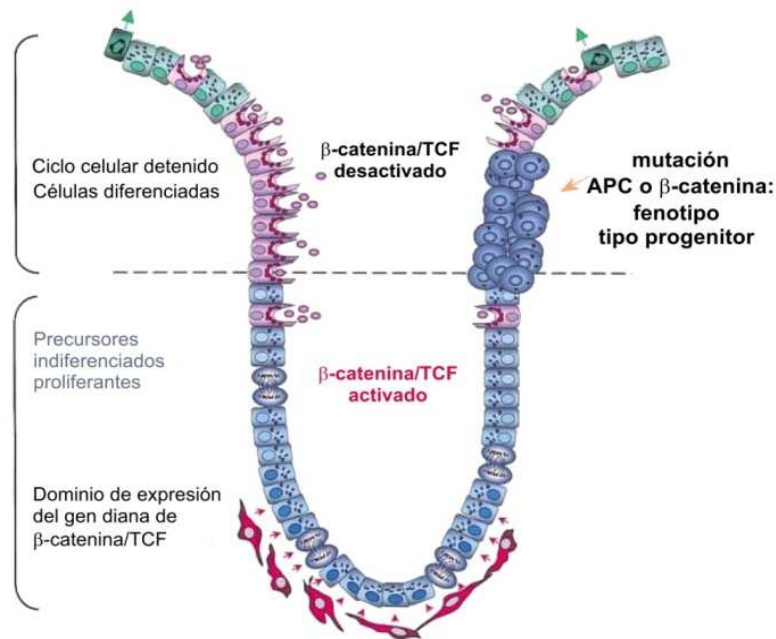
### 1.2.3. Cáncer colorrectal y alteración de la vía WNT

Como se ha explicado anteriormente, la vía de señalización WNT desempeña un papel importante en la renovación y desarrollo normal del epitelio colónico. La desregulación de esta vía provoca alteraciones en el crecimiento celular y es uno de los principales factores implicados en el desarrollo de carcinogénesis en colon <sup>73,74</sup>. En el 90% de los tumores colorrectales se observan alteraciones de algunos de los componentes implicados en la regulación de la vía WNT <sup>17</sup>. En el 85% de los casos de CCR esporádico, así como los casos de adenomatosis polipósica familiar, se observan alteraciones en el gen *APC* <sup>19</sup>. En los casos en los que no existe mutación en el gen *APC* los genes que se ven afectados en mayor medida son *CTNNB* (gen responsable de la expresión de  $\beta$ -catenina) y *AXIN*. Las mutaciones asociadas a estos genes provocan una activación constitutiva de la vía de señalización celular WNT en las criptas intestinales (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Degradación de β-catenina en ausencia de señales *Wnt* (A), bloqueo de la degradación de β-catenina en presencia de señales *Wnt* (B) y activación constitutiva de la vía WNT como consecuencia de mutación del gen APC (C). (tomado de De Sousa y cols.<sup>75</sup>).

La activación constitutiva de la vía de señalización WNT por acumulación de β-catenina en las criptas intestinales bloquea la diferenciación de las células y promueve la proliferación celular. El desequilibrio entre la proliferación celular y la descamación de células en la parte apical de las criptas (Figura 1.11) provoca la formación de pólipos<sup>76</sup>.



**Figura 1.11.** Esquema del desarrollo de las células epiteliales en una cripta intestinal normal (izquierda) y del desarrollo epitelial como consecuencia de mutaciones en genes relacionados con la vía de señalización WNT <sup>76</sup>.

Como se ha señalado anteriormente, la mayor parte de tumores presentan mutaciones en el gen supresor de tumores *APC*. La proteína Apc forma parte del complejo Apc-Axina-GSK3 $\beta$  y es la encargada de unir a  $\beta$ -catenina. Una vez formado el complejo, GSK3 $\beta$  fosforila a  $\beta$ -catenina marcándola para su posterior degradación por ubiquitinación. Además la proteína *Apc* favorece la translocación de la  $\beta$ -catenina desde el núcleo al citoplasma celular. La mutación en el gen *APC* provoca una reducción en la proteína Apc funcional, que induce la activación constitutiva del complejo  $\beta$ -catenina/TCF como consecuencia de la acumulación de  $\beta$ -catenina citoplasmática y su posterior translocación al núcleo <sup>14</sup>. Por tanto, la mutación del gen *APC* se traduce en la pérdida de regulación de la vía WNT, la acumulación de  $\beta$ -catenina y una proliferación celular anormal.

#### 1.2.4. Modelos animales para el estudio de cáncer colorrectal

Los modelos animales más utilizados para el estudio del desarrollo del cáncer colorrectal han sido de rata y ratón. En el caso de los modelos en ratón, el desarrollo del cáncer colorrectal puede ser consecuencia de inducción química, o por manipulación genética (modelos genéticos).

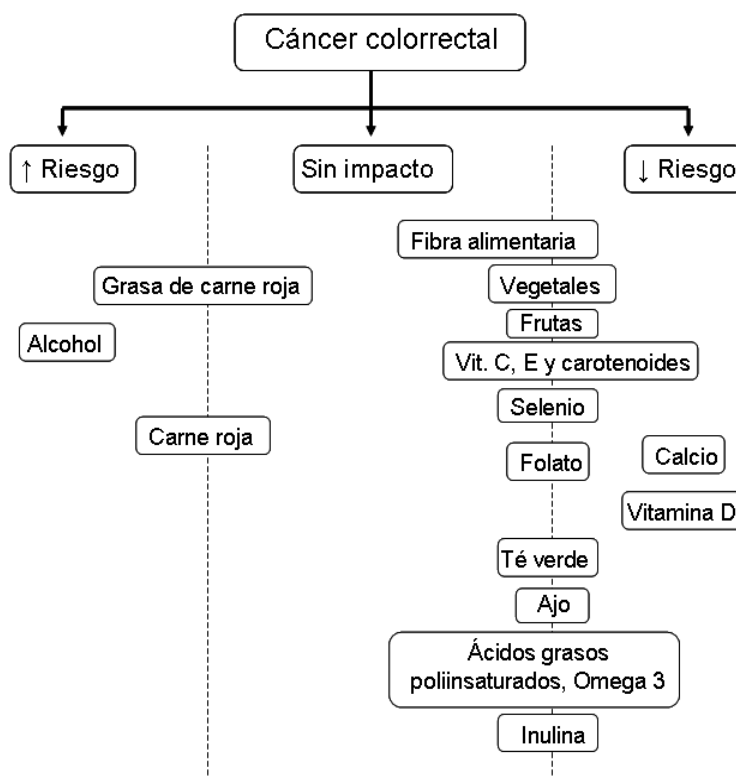
La inducción química de la carcinogénesis en ratones se produce mediante la administración de compuestos mutagénicos como son los precursores de metil-azoxi-metanol glucósido [1,2-dimetilhidrazina (DMH) y azoximetano (AOM)] y las aminas heterocíclicas. Estos compuestos producen mutaciones somáticas en los genes *APC*, *K-Ras* y/o  $\beta$ -catenina entre otros <sup>77</sup>. Dichas mutaciones provocan tumores en los que se observa acumulación de  $\beta$ -catenina. Los modelos de ratones inducidos químicamente se han propuesto como un buen modelo para estudiar el CCR esporádico.

Los modelos genéticos de cáncer colorrectal se basan en animales que portan una mutación inducida en la línea germinal y que provoca el desarrollo espontáneo de tumores. Entre los modelos genéticos, destacan aquellos en los que la mutación provoca la desregulación de la vía de señalización celular WNT, la inactivación de los mecanismos de reparación de ADN o bien la modificación de la vía del factor de crecimiento TGF- $\beta$  <sup>78</sup>. Los ratones de la cepa *APC*<sup>Min/+</sup> portan una mutación en el codón 850 del gen *Apc*, que da lugar a una proteína trunca carente de funcionalidad. Esta mutación del gen *Apc* (“*Multiple intestinal neoplasia*” o *Min*) se descubrió en la progenie de ratones machos de la cepa C57BL/6J mutagenizados con N-etil-N-nitrosourea. Los animales homocigóticos son inviables, mientras que los animales heterocigóticos nacen de forma normal, pero desarrollan más de 100 tumores a lo largo del tracto intestinal y con una esperanza de vida reducida (150 días aproximadamente) <sup>79,80</sup>. Otras características de los animales *APC*<sup>Min/+</sup>, es que desarrollan pólipos intestinales a partir de la cuarta semana de edad, así como pérdida de peso asociada, sangrado gastrointestinal, anemia y caquexia <sup>64</sup>.

### 1.3. RELACIÓN DIETA Y SALUD

Las enfermedades crónicas no transmisibles, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes, están experimentando un aumento constante desde hace 30-40 años en todas las regiones del mundo. Como muestra de este fuerte incremento, cabe destacar que en el año 2001 este tipo de enfermedades causaron aproximadamente el 60% de las defunciones mundiales y el 46 % de la carga de morbilidad, mientras que la OMS prevé que en el año 2020 el 75% de las muertes que se produzcan en el mundo estarán relacionadas con este tipo de enfermedades, y supondrán el 57% de la morbilidad (OMS, 2002). El desarrollo de enfermedades crónicas se encuentran muy relacionadas con los hábitos de vida (Choi y col, 2001), entre los que se incluyen la dieta.

Estudios epidemiológicos muestran la relación entre la ingesta de dietas ricas en frutas y vegetales y la disminución en el riesgo de enfermedades cardiovasculares <sup>81</sup> así como de diferentes tipos de cáncer gastrointestinal (cáncer de estómago y de colon) <sup>82</sup>. En la Figura 1.12 se muestra la relación existente entre diferentes compuestos de la dieta y el riesgo de padecer CCR.



**Figura 1.12.** Componentes de la dieta asociados con incremento o descenso del riesgo de cáncer colorrectal (modificado de Azcárate-Peril y col. <sup>83</sup>).

Además de buscar mejoras farmacológicas y terapéuticas en el tratamiento médico para los pacientes, se establece como una prioridad en las políticas de salud pública la búsqueda de nuevos mecanismos de prevención. Es así que la prevención primaria supone la acción más económica, asequible y sostenible para hacer frente al aumento de enfermos crónicos en todo el mundo. Debido a que la dieta tiene un papel determinante en la salud, tanto a corto como a largo plazo <sup>84</sup>, supone también una oportunidad de prevención en multitud de enfermedades de carácter crónico. Por ello, es necesario profundizar en el conocimiento de la relación existente entre los componentes de la dieta y las diferentes enfermedades, con el fin de poder establecer políticas preventivas y terapéuticas adecuadas.

Cabe destacar que en el mantenimiento de la salud son importantes no sólo los nutrientes, sino también otros compuestos contenidos en la dieta, así como los microorganismos beneficiosos de la microbiota intestinal <sup>85</sup>.

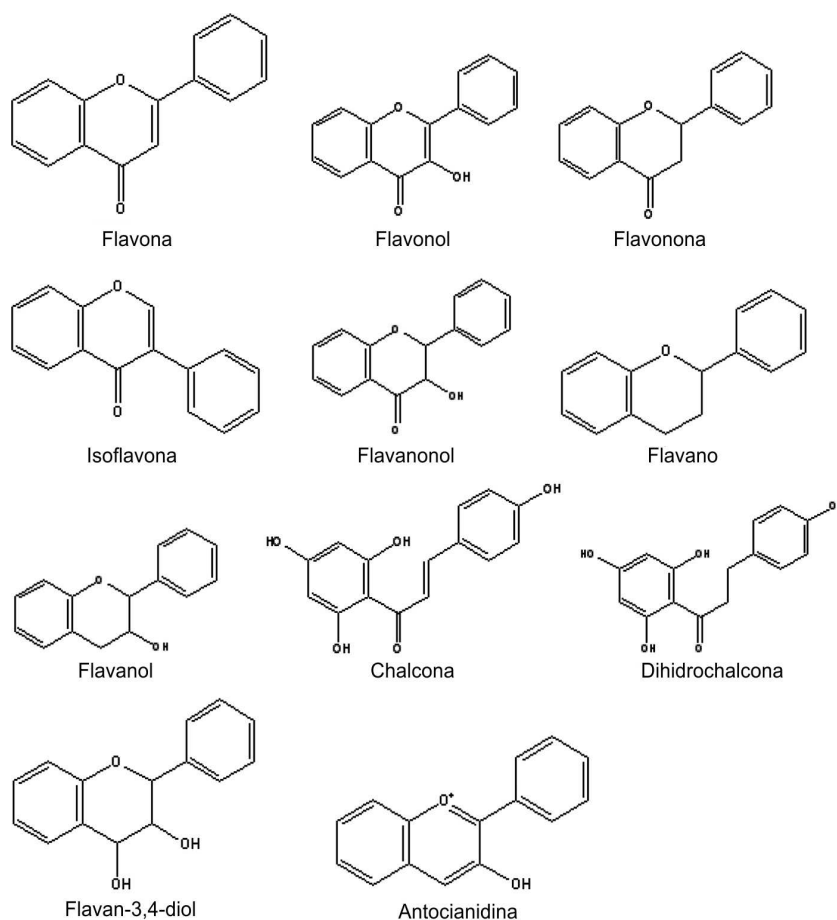
### 1.3.1. Los compuestos bioactivos alimentarios: la quercetina

Además de los nutrientes, la dieta habitual proporciona otras sustancias que desempeñan una función biológica beneficiosa para el organismo. Tales sustancias, que se han denominado genéricamente *compuestos bioactivos*, son de naturaleza química muy heterogénea (polifenoles, carotenoides, organosulfurados, conjugados del ácido linoleico, etc.) y generalmente de procedencia vegetal. Poseen funciones reguladoras de la actividad intestinal, tienen actividad antioxidante y antiinflamatoria, por lo que de alguna forma tienen un efecto beneficioso sobre la salud <sup>86</sup>. En el caso del cáncer colorrectal, se ha propuesto que los compuestos bioactivos pueden prevenir su desarrollo actuando en diferentes estadios del cáncer colorrectal (Figura 1.9).

Los polifenoles son uno de los principales grupos de compuestos bioactivos. Aunque se han descrito más de 8000 polifenoles distintos, los más importantes son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. Estas moléculas, presentes de forma natural en las plantas, son metabolitos secundarios que actúan como pigmentos, además de proteger a las plantas de la radiación ultravioleta y la agresión por patógenos <sup>87</sup>. Al formar parte de los vegetales, estos compuestos se incorporan a la dieta humana <sup>88</sup>, siendo los responsables, en gran medida, de las características organolépticas, especialmente el color y sabor de los vegetales. En los últimos años, se ha producido un incremento del interés por los polifenoles, tanto desde el punto de vista científico como por parte de la industria alimentaria. Las principales razones que explican este interés son la capacidad antioxidante, la abundancia en la dieta humana y el descubrimiento de su posible implicación en la prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y cáncer <sup>87</sup>. Los polifenoles, además de su capacidad antioxidante, presentan actividades biológicas interesantes en el ámbito de la salud como son; capacidad anti-inflamatoria, anti-viral, anti-bacteriana y anti-carcinogénica <sup>89</sup>. Se estima que los efectos beneficiosos de dietas ricas en vegetales y frutas se deben, en parte, a la ingesta de polifenoles <sup>90</sup>.

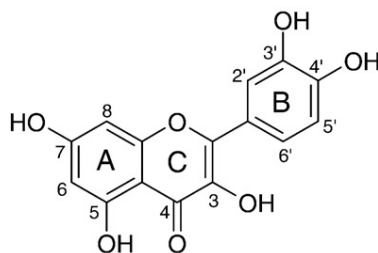
Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más abundante en plantas y se han identificado más de 4.000 compuestos diferentes <sup>88</sup>. Los flavonoides comparten una estructura común formada por dos anillos de naturaleza fenólica, que se encuentran unidos por un heterociclo oxigenado de 3 carbonos (C6-C3-C6). Los flavonoides se dividen a su vez en función del estado de oxidación de la cadena de carbonos en flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Figura 1.13).





**Figura 1.13.** Esquema de la estructura química de los principales grupos de flavonoides (obtenido de Corradini y col. <sup>91</sup>).

La quercetina (Figura 1.14) destaca de entre los flavonoles por encontrarse ampliamente distribuido en el reino vegetal y por ser el polifenol más representativo en la dieta humana. Está presente de forma natural en multitud de alimentos vegetales de consumo habitual (manzana, cebolla y otros muchos vegetales) y ciertas bebidas obtenidas a partir de productos vegetales (té y vino entre otras).



**Figura 1.14.** Estructura molecular de la quercetina.



La quercetina presenta diversas actividades biológicas con efectos beneficiosos sobre la salud, ejerciendo un papel protector frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer. Algunos de los efectos atribuidos a la quercetina son: actividad anticarcinogénica, capacidad antioxidante <sup>92</sup>, actividad anti-inflamatoria <sup>93</sup>, acción antiproliferativa <sup>94</sup>, acción proapoptótica <sup>95</sup>, regulación de la señalización celular y supresión de factores de crecimiento <sup>96</sup>.

Estudios *in vitro* muestran que la quercetina inhibe la proliferación celular e incrementa los niveles de apoptosis <sup>97</sup> en líneas celulares de diferente origen (colon, cervix, próstata, pulmón y mama). Se ha propuesto que la acción antiproliferativa de la quercetina puede deberse a su acción sobre proteínas reguladoras del ciclo celular, incluidas ciclinas (A, B, D y E), ciclinas dependientes de quinasas (*Cdks*) e inhibidores *Cdk* como *p21* y *p27* <sup>98</sup>.

La quercetina también se relaciona con una disminución del número de lesiones preneoplásicas en estudios *in vivo*. En este sentido se ha observado que la quercetina tiene un papel protector en el desarrollo de tumores en modelos de cáncer colorrectal inducidos por azoximetano <sup>99,100</sup>, reduciendo la proliferación celular y la expresión de marcadores de inflamación como COX-1 y COX-2 <sup>100</sup>. En animales APC<sup>Min/+</sup> se ha observado que la suplementación de dietas con quercetina a una concentración del 0,02% reduce el número de pólipos, reduciendo además el número de macrófagos y la inflamación intestinal <sup>101</sup>. Las investigaciones sobre la toxicidad de quercetina en animales de experimentación han demostrado que la toxicidad es muy baja, hasta concentraciones de 3.000 mg de quercetina/ Kg de peso corporal/día no dan lugar a alteraciones en el peso, en la bioquímica, ni en la histología de los animales <sup>102</sup>.

### 1.3.2. Los probióticos

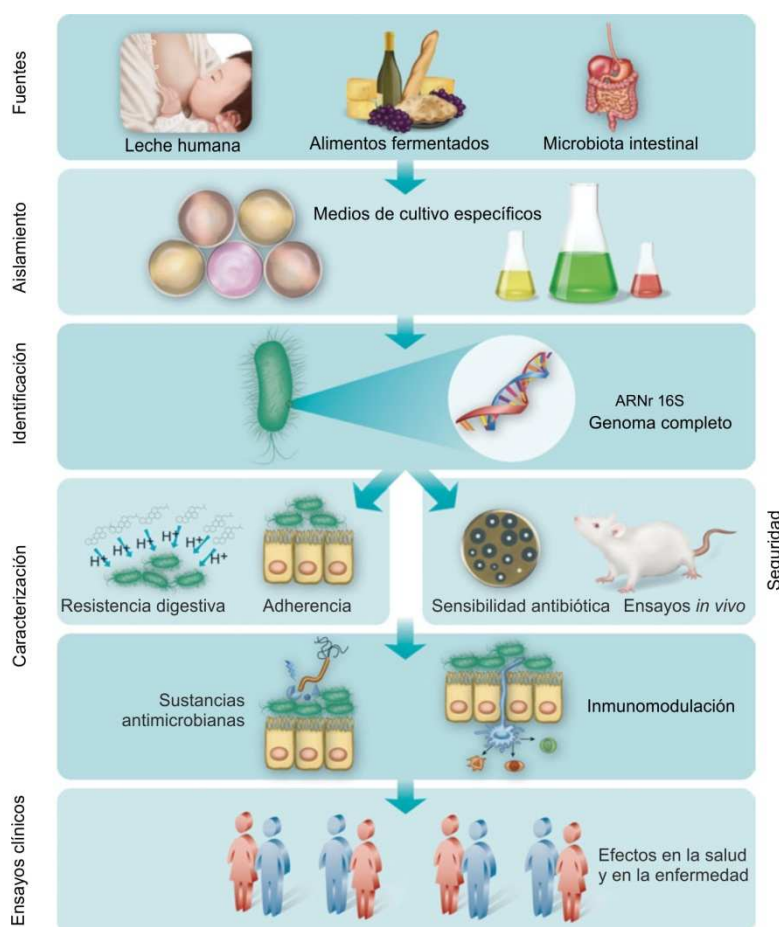
El término “probiótico” es relativamente nuevo, sin embargo, no lo es el conocimiento sobre los efectos beneficiosos de las bacterias ácido lácticas. Eli Metchnikoff sugirió en el año 1907 que las bacterias contenidas en los productos lácteos fermentados pueden modificar la microbiota intestinal, inhibiendo el crecimiento de microbios patógenos e incrementando microbios beneficiosos <sup>103</sup>. Las observaciones sobre los efectos beneficiosos de los probióticos se basaron en la alta longevidad y buena salud general de las poblaciones de campesinos búlgaros, en cuya dieta estaban presentes de forma destacada los productos lácteos fermentados.

El termino *probiótico* se utilizó por primera vez en 1965 por Lilly y Stiwell <sup>104</sup> para denominar las sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro. A partir de ese momento, la definición de probiótico ha evolucionado. Actualmente se define como: “aquellos microorganismos vivos, que en animales y humanos, ejercen un efecto beneficioso sobre el hospedador, mejorando las propiedades de la microflora” <sup>105</sup>.

Un microorganismo se considera probiótico cuando presenta las siguientes características <sup>106</sup>:

- Encontrarse habitualmente en el intestino.
- Tener un tiempo corto de reproducción.
- Ser capaz de producir compuestos antimicrobianos, tales como ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.
- Ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que alcance al intestino.
- Adherirse a las células intestinales, persistir y multiplicarse.
- No ser invasivo, carcinogénico ni patógeno.
- Deben poder agregarse a la microbiota normal.

El proceso de aislamiento, identificación y caracterización de cepas necesario para que sean consideradas probióticas se muestra esquemáticamente en la Figura 1.15.



**Figura 1.15.** Esquema del proceso de caracterización de cepas probióticas. Tomado de Fontana y cols <sup>107</sup>

Las bacterias ácido lácticas, y concretamente los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son los microorganismos utilizados con mayor frecuencia como probióticos, aunque no son los únicos <sup>84</sup>. En la Tabla 1.1 se muestran los microorganismos considerados probióticos <sup>108</sup>.

Los probióticos compiten con las bacterias patógenas por adherirse a las células epiteliales, actuando como barrera frente a patógenos. Bernet y cols. <sup>109</sup>, apreciaron que *Lactobacillus acidophilus* producía la inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimorium* en la línea celular Caco-2. Los probióticos producen ácido láctico, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, etanol, diacetilo y bacteriocinas (Figura 1.16). Todos estos productos dificultan el crecimiento de otro tipo de bacterias, incluidas cepas patógenas <sup>110</sup>. Por ejemplo, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que *Bifidobacterium infantis* inhibe el crecimiento de *Bacteroides vulgatus* <sup>111</sup>.

Una de las aplicaciones más comunes es el uso de probióticos frente a las diarreas, ya que reducen la duración así como la frecuencia de las mismas <sup>112</sup>. La acción beneficiosa de los probióticos frente a las diarreas se atribuye tanto a la capacidad antimicrobiana de los probióticos, como a su capacidad de restablecer el equilibrio en la microbiota intestinal, reforzando la barrera frente a patógenos <sup>113</sup>.

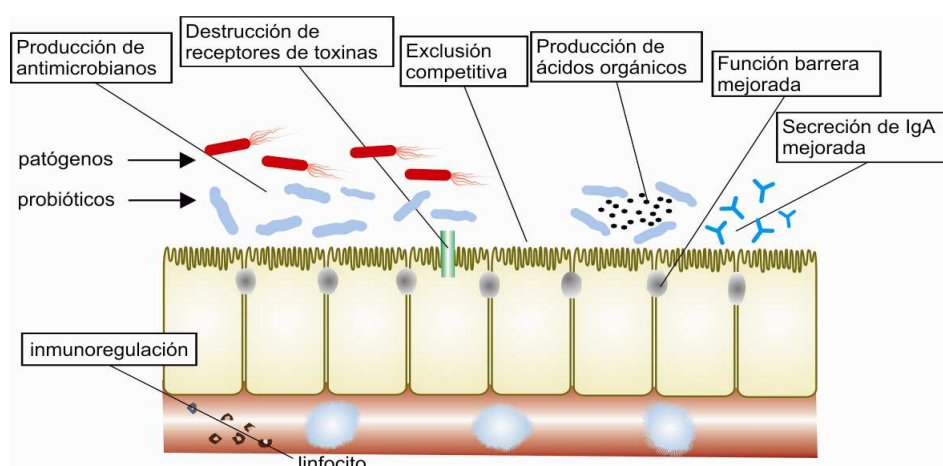
**Tabla 1.1.** Microorganismos considerados como probióticos <sup>108</sup>.

| Lactobacilos   | Bifidobacterias  | Otras bacterias ácido lácticas   | Bacterias no ácido lácticas  |
|--|--|--|--|
| <i>L. acidophilus</i><br><i>L. amylovorus</i><br><i>L. casei</i><br><i>L. crispatus</i><br><i>L. delbrueckii</i><br><i>subsp. Bulgaricus</i><br><i>L. gallinarum</i><br><i>L. gasseri</i><br><i>L. johnsonii</i><br><i>L. Paracasei</i><br><i>L. plantarum</i><br><i>L. reuteri</i><br><i>L. rhamnosus</i> | <i>B. adolescentes</i><br><i>B. animalis</i><br><i>B. bifidum</i><br><i>B. breve</i><br><i>B. infantis</i><br><i>B. lactis</i><br><i>B. longum</i> | <i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecium</i><br><i>Lactococcus lactis</i><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Pediococcus acidilactici</i><br><i>Sporolactobacillus inulinus</i><br><i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Bacillus cereus var. toyoi</i><br><i>Escherichia coli cepa nisle</i><br><i>Propinebacterium freudenreichii</i><br><i>Sacharomices cerevisiae</i><br><i>Sacharomices boulardii</i> |

Los probióticos también reducen la inflamación intestinal en enfermedades con inflamación crónica como son la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, actuando como inmunomoduladores, por lo que son de gran interés en la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal <sup>114</sup>.

Del mismo modo, algunos estudios epidemiológicos relacionan el consumo de leches fermentadas con un menor riesgo de sufrir CCR. Se ha propuesto que los probióticos previenen el desarrollo de cáncer colorrectal favoreciendo el mantenimiento de una microbiota intestinal saludable, modificando las condiciones fisicoquímicas del colon, inactivando compuesto carcinógenos, favoreciendo la nutrición de las células epiteliales mediante la producción de ácidos grasos y elevando la respuesta inmune, especialmente a nivel gastrointestinal <sup>84,114</sup>.

Se ha observado que la alimentación con yogures y algunos probióticos reducen la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa y nitroreductasa <sup>115</sup>. Este hecho es especialmente importante en el desarrollo de cáncer intestinal, puesto que las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa de las bacterias intestinales son las responsables de revertir la conjugación de compuestos tóxicos inactivados en el hígado mediante conjugación con ácido glucurónico y que son eliminados por vía biliar. La acción de estas enzimas activa nuevamente estos compuestos, los cuales pueden actuar como carcinógenos.



**Figura 1.16.** Mecanismos de acción de los microorganismos probióticos (esquema tomado de Ewaschuk y cols.<sup>114</sup>).

Otro de los factores que incrementan el riesgo de padecer cáncer colorrectal es la ingesta de dietas ricas en carne. Diversos estudios han relacionado este hecho con la formación de aminas aromáticas heterocíclicas (compuestos altamente mutagénicos) durante el proceso de cocinado de las carnes<sup>116,117</sup>. En este sentido, se ha propuesto que los probióticos y otras bacterias presentes en la microbiota intestinal pueden metabolizar compuestos carcinogénicos como las aminas aromáticas heterocíclicas, degradándolas e inactivándolas<sup>118</sup>.

Existen pruebas científicas de que los microorganismos probióticos pueden regular los mecanismos de proliferación celular y apoptosis<sup>119</sup>, puntos cruciales en la prevención del desarrollo de CCR.

El riesgo derivado de infección o sepsis por consumo de probióticos es extremadamente bajo, debido a que como se ha comentado previamente, estos son constituyentes normales de la microbiota intestinal y no son patógenos. Las únicas referencias a sepsis, bacteriemias o endocarditis, producidas por probióticos se reducen a pacientes con graves enfermedades de base (valvulopatías, problemas hematológicos, SIDA, pacientes en cuidados intensivos, nutrición parenteral, pacientes con cáncer en estado muy avanzado)<sup>120</sup>. A nivel general, se acepta que el riesgo de infección por el consumo de probióticos es similar al de infecciones por cepas comensales, por lo tanto muy bajo incluso en pacientes inmunodeprimidos<sup>121</sup>, y son los beneficios mayores a los posibles riesgos.

### 1.3.2.1. Género *Bifidobacterium*

Las cepas del género *Bifidobacterium* representan el 90% de la microbiota intestinal en niños <sup>122</sup> y alrededor del 15% en adultos sanos <sup>123</sup>. La presencia de cepas de *Bifidobacterium* en la microbiota intestinal se ha relacionado con efectos beneficiosos sobre la salud, especialmente en el tratamiento de diarreas y en la prevención de inflamación del tracto gastrointestinal <sup>124</sup>.

*Bifidobacterium bifidum* (*Bf*) es un colonizador habitual del tracto digestivo y es empleada ampliamente en la industria alimentaria, especialmente en la producción de productos lácteos fermentados. Es una cepa reconocida como probiótico. *Bf* mejora la integridad intestinal en modelo de ratas con colitis necrotizante, disminuyendo además los niveles de expresión de la citoquina proinflamatoria IL-6. En modelos de ratones con colitis, la ingesta de *Bf* reduce la diarrea, la pérdida de peso asociada a la colitis e inflamación intestinal <sup>125</sup>. La ingesta de *Bf* reduce la actividad  $\beta$ -glucuronidasa y el número de lesiones preneoplásicas en ratas inducidas con dimetilhidrazina <sup>126</sup>.

### 1.3.2.2. Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* representa un grupo de bacterias ácido lácticas de gran importancia en la industria alimentaria, especialmente en la producción de productos lácteos fermentados. En el organismo, las cepas de *Lactobacillus* tienen un papel especialmente importante en el mantenimiento de la salud urogenital, formando una capa protectora que contribuye a crear un efecto barrera <sup>127</sup>. Además, se ha descubierto que algunas cepas de *Lactobacillus* presentan efectos antiproliferativos en células de cáncer de estómago HGC-27 y de mama MCF7 <sup>128,129</sup>.

*Lactobacillus gasseri* (*Lg*) es una cepa que se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal y es considerada una cepa probiótica. Estudios recientes muestran que la suplementación de dietas con *Lg* reduce la obesidad en ratones alimentados con dietas inductoras de obesidad <sup>130</sup>, así como el número de focos de criptas aberrantes y lesiones tumorales en ratones con cáncer colorrectal inducidos con dimetilhidrazina <sup>131</sup>.

## 1.3.3. Combinación de compuestos bioactivos y probióticos

Además de los efectos beneficiosos de los diferentes compuestos administrados de forma individual, se ha observado que la administración conjunta de diferentes nutracéuticos incrementa los beneficios obtenidos. La existencia de sinergias entre diferentes cepas de probióticos, hace que la tendencia actual sea la administración de varias cepas de forma conjunta. Además, se ha observado que la administración conjunta de probióticos con otros compuestos bioactivos incrementan los efectos de estos compuestos administrados de forma independiente. El ejemplo

más estudiado de sinergias entre diferentes compuestos bioactivos son la administración conjunta de probióticos y prebióticos, los llamados simbióticos. En este caso se ha propuesto que los prebióticos son un sustrato que favorece el crecimiento de las cepas probióticas, estimulando su crecimiento <sup>132</sup>. Por ejemplo, la administración conjunta de *Bf* e inulina disminuyen el número de lesiones preneoplásicas en animales inducidos con azoximetano <sup>133</sup>, mientras que la administración individual no muestra efecto.

Se ha propuesto que los polifenoles también podrían actuar de forma sinérgica con los probióticos, aunque el conocimiento en este sentido es muy limitado. Los polifenoles han demostrado capacidad de modificar el crecimiento de diferentes cepas de bacterias presentes en la microbiota intestinal, destacando la inhibición de algunas cepas patógenas como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* y la promoción de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* <sup>134</sup>. Además, se ha observado que la administración conjunta de un extracto de arándanos (que contenía carbohidratos y polifenoles) y una mezcla de probióticos modifica la fermentación colónica en ratas <sup>135</sup>.

Para concluir, uno de los problemas a los que se enfrenta la utilización de compuestos bioactivos con fines preventivos o terapéuticos es que diferentes estudios preclínicos y clínicos, muestran que este tipo de compuestos tienen una eficacia limitada, atribuida fundamentalmente a su baja biodisponibilidad, provocando que lleguen en una concentración reducida al lugar deseado. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos se han desarrollado nuevos métodos de administración, como por ejemplo el uso de nanopartículas, microcápsulas, liposomas e implantes <sup>136</sup>, los cuales incrementan sus efectos preventivos y terapéuticos. En el mismo sentido, la microencapsulación de probióticos los protege de las condiciones ácidas del tracto gastrointestinal, incrementando la supervivencia de los mismos <sup>137</sup>.





## 2). Objetivos

---



Los trabajos presentes en la literatura científica muestran que la dieta y la microbiota intestinal desempeñan un papel determinante en la salud, ya que contribuyen a mantener el sistema gastrointestinal en condiciones anatómicas y fisiológicas óptimas. En este sentido, se ha comunicado que tanto las dietas que contienen polifenoles como las que contienen probióticos actúan de forma beneficiosa sobre la salud, y posiblemente puedan prevenir o paliar el desarrollo de enfermedades como el cáncer colorrectal, entre otras.

Tanto las personas como los animales que desarrollan cáncer colorrectal presentan alteraciones tales como: caquexia, sangrado intestinal y alteraciones metabólicas. Estas alteraciones reducen la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes.

La hipótesis de partida que se propone en el presente estudio es que la alimentación de animales APC<sup>Min/+</sup> con dietas suplementadas con microcápsulas de probióticos y quercetina pueden:

- reducir síntomas asociados al desarrollo del cáncer colorrectal.
- modificar la composición de la microbiota intestinal.
- afectar positivamente al metabolismo energético de los animales.
- reducir el número de lesiones en el colon.
- modificar los niveles de expresión de genes involucrados en la vía de señalización WNT.

Por todo ello, el objetivo principal del presente trabajo se centró en investigar los efectos de dietas suplementadas con los probióticos microencapsulados *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* con o sin quercetina microencapsulada en ratones Apc<sup>Min/+</sup>, que pueden desarrollar cáncer colorrectal.

Para alcanzar esta meta, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar los efectos fisiológicos en ratones Apc<sup>Min/+</sup> alimentados con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* con o sin quercetina microencapsulada sobre:
  - a) el crecimiento.
  - b) la composición de la microbiota intestinal.
  - c) el sangrado intestinal.
  - d) la histología del colon.
  - e) la incidencia y el número de focos de cripta aberrantes (ACF) y de tumores en el colon.

- 2) Estudiar los efectos de la alimentación de ratones  $Apc^{Min/+}$  alimentados con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* con o sin quercetina microencapsulada en el metabolismo mediante el análisis de:
  - a) el cociente respiratorio y el gasto energético.
  - b) la actividad enzimática y la expresión de transportadores de glucosa y péptidos en yeyuno.
  
- 3) Determinar los niveles de expresión de genes relacionados con la proliferación celular en ratones  $Apc^{Min/+}$  alimentados con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* con o sin quercetina microencapsulada, mediante el análisis de:
  - a) niveles de expresión de genes de la vía de señalización WNT en el colon distal.
  - b) concentración de la proteína  $\beta$ -catenina en colon distal.
  - c) el estado de metilación de genes implicados en la vía de señalización WNT.





### **3). Material y Métodos**

---





### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.1.1. Modelo animal

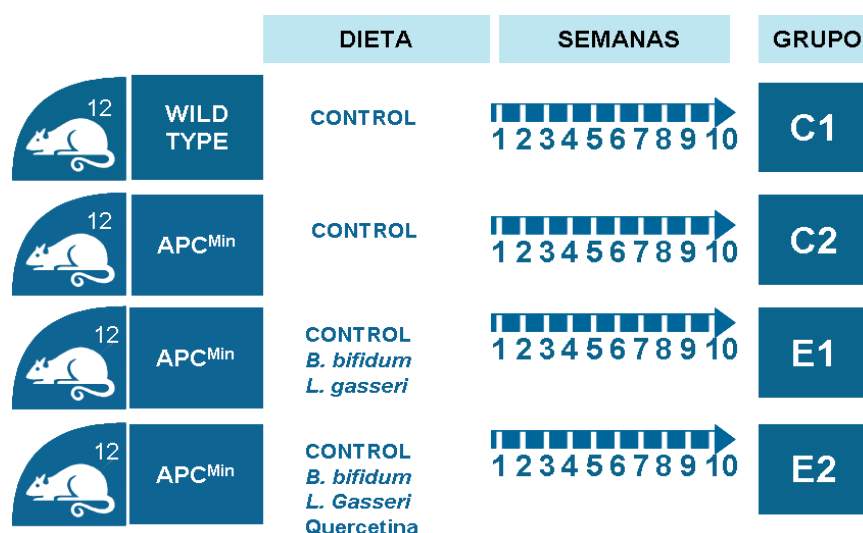
En la realización de este estudio se utilizaron ratones machos de las cepas C57Bl/6J (cepa salvaje) y C57Bl/6J-Apc<sup>Min</sup>/J (Apc<sup>Min/+</sup>). Los animales de la cepa Apc<sup>Min/+</sup> portan una mutación en el gen *Apc* que provoca el desarrollo de multitud de tumores en el tracto gastrointestinal de forma espontánea y en edades tempranas. Los animales de la cepa C57Bl/6J son animales de la misma estirpe, sin embargo no portan la mutación causante del desarrollo de adenomas, estos animales se utilizaron como control cepa salvaje. Ambas cepas de ratones las suministró Charles River Laboratories (Barcelona, España), aunque la cepa C57Bl/6J-APC<sup>Min</sup>/J se obtuvo de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los animales de ambas cepas llegaron a nuestras instalaciones con cinco semanas de edad y con pesos corporales comprendidos entre los 16 y 20 g.

La estabulación de los animales se realizó en jaulas con tapa de filtro (dos animales por jaula) en una habitación dotada con sistema de ventilación regulada y bajo condiciones ambientales controladas (temperatura de 22±2°C, humedad relativa del 55±5% y ciclos alternos con 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz).

#### 3.1.2. Estudio experimental

Se utilizaron 12 ratones de la cepa salvaje C57BL6/J (no portadora de la mutación) y 36 ratones de la cepa C57BL6/J-Apc<sup>Min/+</sup>/J (portadores de la mutación). Tras el período de aclimatación, y como se esquematiza en la Figura 3.1, se establecieron los siguientes cuatro grupos experimentales ( $n=12$ ):

- Grupo C1: ratones de la cepa salvaje C57BL6/J alimentados con la dieta control.
- Grupo C2: ratones de la cepa Apc<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta control.
- Grupo E1: ratones de la cepa Apc<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con *Bf* y *Lg* microencapsulados.
- Grupo E2: ratones de la cepa Apc<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina.



**Figura 3.1.** Esquema del diseño experimental seguido en el presente estudio. Se constituyeron cuatro grupos experimentales, dos de ellos alimentados con dietas control (C1 y C2) y otros dos alimentados con dietas suplementadas (E1 y E2).

Durante el período de experimentación los animales tuvieron acceso “*ad libitum*” a alimento y bebida. Se registraron diariamente las ingestas. El peso corporal se registró semanalmente.

### 3.1.2.1. Recogida de heces

Durante el período experimental se recogió una vez por semana la totalidad de las deposiciones correspondientes a un período de 24 horas. Estas muestras de heces se destinaron a posteriores recuentos de bacterias y detección de sangre oculta en las mismas.

### 3.1.2.2. Disección y post-mortem

Transcurridas las diez semanas y media correspondientes al período experimental se procedió al sacrificio de los animales. Durante las 24 horas previas, se restringió el acceso al alimento, manteniéndose únicamente acceso a la bebida. Los animales se anestesiaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, tras lo que se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardiaca. Inmediatamente, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical.

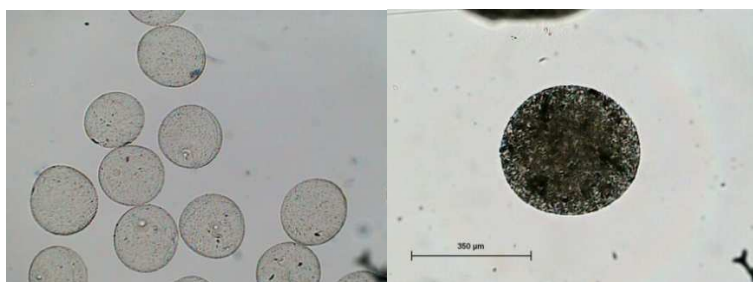
Los animales se diseccionaron y se procedió a la extracción de los siguientes órganos; yeyuno, colon, bazo, hígado, ciego, timo, glándulas suprarrenales, músculo gastrocnemio, cerebro y testículos. Todos estos órganos se pesaron en el momento de la extracción. Asimismo, se extrajeron los paquetes de grasa abdominal, suprastesticular y perirrenal. El contenido del colon y del ciego se recogió para realizar cultivos microbiológicos. El colon de 4 animales de cada grupo se recogió para la realización de recuentos de focos de criptas aberrantes (ACF) y de pólipos intestinales. Las muestras se lavaron con suero fisiológico, se colocaron sobre papel de filtro y

posteriormente se abrieron longitudinalmente dejando visible la mucosa. Estas muestras se fijaron con una solución de formaldehído 10% (v/v) durante 24 horas. Tras las 24h de fijación se realizaron 3 lavados con etanol 70% durante 10 minutos. Las muestras se conservaron en una solución de etanol 70% (v/v). Para la realización de los análisis histológicos se recogieron 2 cm de colon distal de cuatro animales de cada uno de los grupos. Estas muestras se lavaron con suero fisiológico frío y se abrieron dejando visible la mucosa. Las muestras se fijaron con una solución de formaldehído 10% (v/v) durante 24 horas. Tras las 24h de fijación se realizaron 3 lavados con etanol 70% (v/v) durante 10 minutos. El resto de órganos se conservaron mediante congelación por inmersión en nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a una temperatura de -80°C. Las muestras se conservaron en una solución de etanol 70% (v/v). El procedimiento utilizado en el presente estudio recibió la aprobación del Comité de Ética, Experimentación animal y Bioseguridad de la Universidad Pública de Navarra.

### 3.1.3. Dietas

#### 3.1.3.1. Microencapsulación

Las dietas experimentales se suplementaron con probióticos y quercetina microencapsulados. Para ello se seleccionaron dos especies de bacterias ácido lácticas reconocidas como probióticas, *Bifidobacterium bifidum* (Bf) (cepa CECT 870) y *Lactobacillus gasseri* (Lg) (cepa CECT 4479), ambas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo. Estas cepas fueron microencapsuladas de forma independiente. Las microcápsulas de quercetina se realizaron a partir de quercetina de una pureza del 95% (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las microcápsulas utilizadas en este estudio para la suplementación de las dietas se desarrollaron y elaboraron en colaboración con los laboratorios LEIA, actualmente (Tecnalia), sita en Vitoria. Dichas microcápsulas se componen de una cubierta de alginato y quitosano. Estudios realizados con anterioridad a este trabajo de investigación demostraron que las microcápsulas empleadas (Figura 3.2) protegen las cepas probióticas de las condiciones agresivas del tracto gastrointestinal, incrementándose la supervivencia de los probióticos<sup>137</sup>.



**Figura 3.2.** Fotografías de las microcápsulas utilizadas en el presente estudio: microcápsulas de probióticos (imagen izquierda) y microcápsula de quercetina (imagen derecha).

### 3.1.3.2. Preparación de las dietas

Para la alimentación de todos los animales, tanto en el período de aclimatación como en el experimental, se utilizó la dieta comercial 5K20 (LabDiet® JL, PMI Nutrition International, St. Louis, MI, EE. UU), cuya composición química se detalla en la Tabla 3.1. Dicha dieta está recomendada por el criador para el mantenimiento de los animales de la cepa  $Apc^{Min/+}$  (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE UU).

La dieta suplementada con probióticos microencapsulados se elaboró a partir de la dieta comercial 5K20, de tal manera que 100 g de pienso proporcionarían  $10^7$  ufc de cada una de las bacterias probióticas señaladas en el apartado anterior (*Bf* y *Lg*).

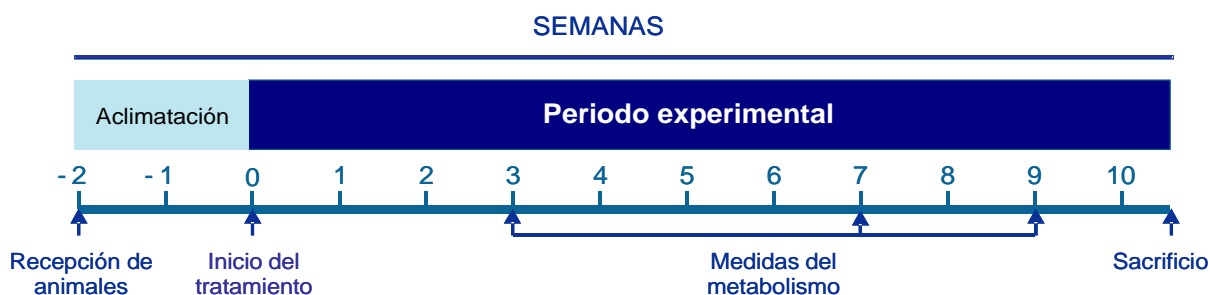
La dieta suplementada con probióticos y quercetina microencapsulados se elaboró a partir de la dieta comercial 5K20, y con las mismas cepas microencapsuladas de *Bf* y *Lg* para que 100 g de la dieta proporcionarían  $10^7$  ufc de cada una de las bacterias, y con quercetina microencapsulada hasta una concentración final de 15mg/100g de dieta. Todas las dietas suplementadas se prepararon semanalmente y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el momento de su utilización.

**Tabla 3.1.** Principales características nutricionales de la dieta 5K20 LabDiet® JL usada como base de la alimentación de los cuatro grupos experimentales (según información proporcionada por el propio fabricante).

| Componente                       | Contenido                         |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Proteína (%)                     | 18,0 (18,80% de la energía total) |
| Grasa (%)                        | 11,0 (28,97% de la energía total) |
| Carbohidratos (%)                | 22,0 (54,22% de la energía total) |
| Fibra bruta (%)                  | 2,0                               |
| Ca (%)                           | 1,2                               |
| P (%)                            | 0,8                               |
| K (%)                            | 0,6                               |
| Fe (ppm)                         | 310                               |
| Vitamina B <sub>12</sub> (µg/kg) | 51                                |
| Energía metabolizable (kcal/g)   | 3,64                              |

### 3.1.4. Cronograma

En la Figura 3.3 se muestra el cronograma del presente estudio. Los animales se mantuvieron en aclimatación durante un período de dos semanas. Transcurrido ese tiempo se inició el tratamiento experimental, el cual tuvo una duración de diez semanas y media. Durante este período se realizaron tres mediciones del metabolismo energético (en las semanas 4, 8 y 10).



**Figura 3.3.** Secuencia temporal del tratamiento experimental seguido en el presente estudio.

### 3.2. MICROBIOTA INTESTINAL

El estudio de la microbiota intestinal de los animales se efectuó mediante el recuento de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, microorganismos anaerobios totales, clostridios, enterobacterias y coliformes, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- En una bolsa estéril se introdujo un gramo de heces y se añadieron 9 mL de Triptona 0,1%. Se homogeneizó la muestra con un homogeneizador Stomacher® 3500 (Seward Ltd, Reino Unido) durante 1 minuto. Esta muestra se tomó como dilución  $10^{-1}$ .
- A partir de la dilución anterior ( $10^{-1}$ ), se prepararon diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-5}$ .
- Se sembraron por duplicado las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en los diferentes medios de cultivo según se detalla a continuación;
  - *Lactobacillus*: Medio MRS. Se sembró 1 mL de la muestra y se incubaron las placas boca abajo a 37°C durante 48h.
  - *Bifidobacterium*: Medio MRS. Se sembró 1 mL de la muestra y se incubaron las placas boca abajo a 39°C en estufa con CO<sub>2</sub> durante 48h.
  - Microorganismos anaerobios totales: Schaedler agar. Se sembró 1 mL de la muestra y se incubaron las placas boca abajo a 35°C durante 24-48h en jarra de anaerobiosis (jarra gaspack).
  - Clostridios: Medio reforzado para clostridios. Se sembró 1 mL de la muestra y se incubaron las placas boca abajo a 35°C durante 24h en jarra de anaerobiosis (jarra gaspack).
  - Enterobacterias: Medio VRBG (39,5g/L). En placas estériles se sembró 1ml de muestra y se añadió 20 ml del medio de cultivo atemperado. Se dejó enfriar hasta que solidificaron las placas y se incubaron a 37°C durante 24h.
  - Microorganismos coliformes: Medio VRBL (39,5g/L). En placas estériles se sembró 1ml de muestra y se añadió 20ml del medio de cultivo atemperado. Se dejó enfriar hasta que solidificaron las placas y se incubaron a 37°C durante 24h.
- El recuento de unidades formadoras de colonias se realizó en aquellas placas con 30-300 colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de heces (ufc/g).

En el anexo I se indica el procedimiento seguido para preparar las placas con los diferentes medios de cultivo empleados.

### 3.3. HISTOLOGÍA DEL COLON

#### 3.3.1. Recuento de lesiones en la mucosa de colon

Se realizó el recuento de lesiones relacionadas con el desarrollo de tumores en la mucosa intestinal (focos de criptas aberrantes y adenomas) <sup>138</sup>. A partir de muestras de colon, previamente abierto longitudinalmente, fijado en formaldehído 10% (v/v) y conservado en etanol 70 % (v/v), se procedió como se detalla a continuación:

- Se colocaron las muestras sobre una placa de Petri de cristal y se hidrataron durante 5 minutos.
- Tras hidratar las muestras, se tiñeron en una solución de 0,5% de azul de metileno durante 1 minuto.
- Se transfirieron las muestras a un portaobjetos de cristal y se analizó la muestra mediante microscopia óptica (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Tokio, Japón) a 100 aumentos y se tomaron fotografías de las lesiones (Nikon D70S, Nikon Corporation, Tokio, Japón). El recuento se realizó a ciego por dos observadores independientes.
- El criterio utilizado para la identificación de las muestras se recoge en la Tabla 3.2 <sup>138</sup>:

**Tabla 3.2.** Criterio de identificación de lesiones intestinales.

| Lesión                     | Características  |
|----------------------------|--|
| Foco de criptas aberrantes | Incremento de tamaño.<br>Incremento de la intensidad de tinción.<br>Luz de la cripta con forma irregular.<br>Engrosamiento del borde de la cripta. |
| Adenoma                    | Lesiones formadas por más de 12 criptas aberrantes   |

#### 3.3.2. Análisis de cortes histológicos de mucosa de colon

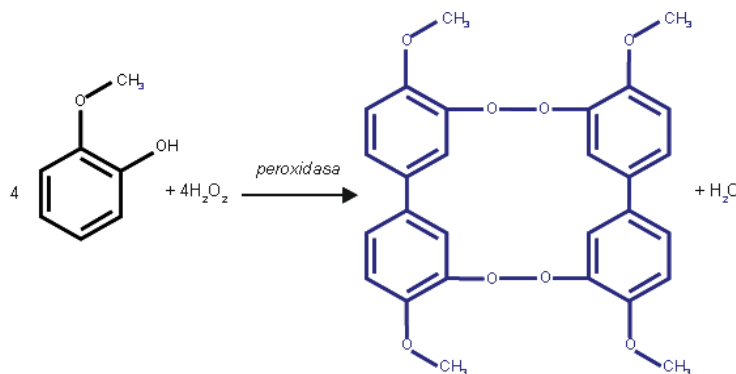
A partir de muestras de colon fijadas en formaldehído se procedió a la inclusión de las muestras en bloques de parafina y a la realización de cortes seriados de 3µm de espesor mediante el uso de micrótopo (HM325, Microm GMBH, Walldorf, Alemania). Los cortes se mantuvieron 15 minutos a 60 °C y se desparafinaron en xileno durante 30 minutos. A continuación se rehidrataron mediante pasos sucesivos por alcoholes de concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Los cortes fueron teñidos con la tinción hematoxilina-eosina, deshidratados y finalmente montados para su posterior análisis.

Las preparaciones histológicas se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation Tokyo, Japón) y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon D70S (Nikon Corporation Tokyo, Japón).

### 3.4. DETECCIÓN DE SANGRE OCULTA EN HECES

La presencia de sangre oculta en heces es común en diversas enfermedades del tracto digestivo, y su detección es utilizada como una prueba de cribado de CCR. El modelo animal de cáncer colorrectal utilizado en el presente estudio (ratones  $Apc^{Min/+}$ ) presenta sangrado intestinal asociado al desarrollo de tumores en el tracto gastrointestinal. Por ello se analizaron muestras de heces recogidas en la 1ª y 9ª semana de experimentación con el fin de detectar la presencia de sangre oculta en heces y de este modo estudiar el efecto de las dietas suplementadas sobre este signo de la enfermedad.

La detección de sangre oculta en heces se realizó según la técnica del guayaco <sup>139</sup>. Dicha técnica se basa en la capacidad de la hemoglobina y del grupo *hemo* para actuar como peroxidasa, catalizando la liberación de oxígeno del peróxido de hidrógeno. Esta reacción provoca la posterior oxidación de los compuestos fenólicos presentes en el guayacol (incolores) rindiendo tetraguayacol (el cual presenta coloración) (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Reacción para la detección de sangre oculta en heces basada en la técnica del guayacol. En presencia de sangre se obtiene un complejo coloreado de tetraguayacol.

La detección de la prueba de sangre oculta en heces se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

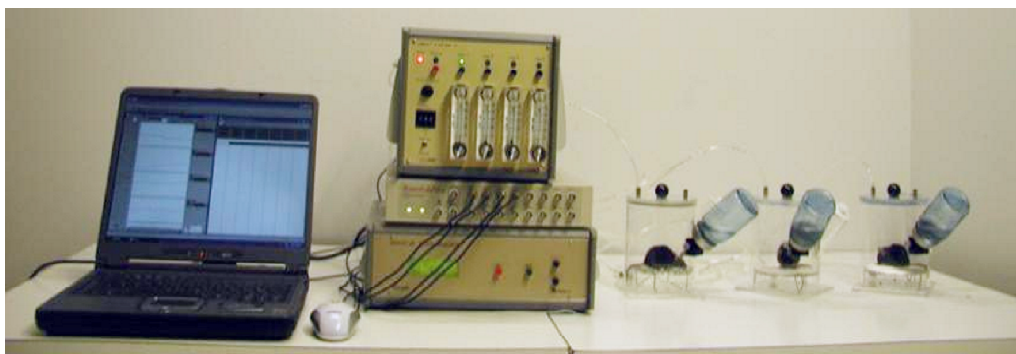
- Se tomaron tres muestras aleatorias de las heces (0,25 g aproximadamente) de cada una de las jaulas (2 animales por jaula). En total se analizaron 18 muestras por cada grupo experimental.



- Se hidrataron las muestras y se homogeneizaron mediante un agitador tipo vórtex, con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica.
- Se añadieron dos gotas de la muestra sobre el papel con guayacol (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y seguidamente se añadió una gota de peróxido de hidrógeno.
- Tras dos minutos de espera, los resultados se determinaron mediante la observación a ciego por parte de dos observadores independientes. El resultado se expresó como:
  - negativo: ausencia de coloración.
  - leve: ligera coloración.
  - moderado: coloración intensa, especialmente en los bordes de la gota de muestra.
  - alto: coloración intensa en la totalidad del diámetro de la gota de muestra.

### 3.5. METABOLISMO ENERGÉTICO

El estudio del metabolismo energético se realizó mediante calorimetría indirecta en un sistema de circuito abierto. Esta técnica se basa en la monitorización del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono por parte de los animales durante un período de tiempo determinado. Para la realización de esta técnica, los animales se alojaron de forma individual en una cámara cerrada herméticamente, provista de tomas destinadas a la renovación del aire. El aire bombeado a las jaulas, así como el que se extrae de las mismas pasa por un analizador de oxígeno y dióxido de carbono, que cuantifica la concentración de ambos gases tanto en el aire inspirado como en el espirado (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Equipo usado en la calorimetría indirecta (de izquierda a derecha), ordenador para la captura de datos, equipo Oxylet 00 de Panlab (módulo inferior: analizador de gases, módulo central: transductor de datos, módulo superior: regulador de flujo de aire) y jaulas calorimétricas.

El consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono se analizó mediante el uso del calorímetro indirecto modelo Oxylet 00 (Panlab, S.L., Barcelona). Los registros se realizaron de forma automática en intervalos de tres minutos por jaula durante un período total de 2 horas, manteniéndose un flujo constante de aire de 270 mL/min. Durante la medición, los animales tuvieron acceso a agua “*ad libitum*”, y no se les facilitó alimento.

Los animales necesitaron un período de adaptación a las jaulas en las que se realizó la calorimetría, durante el cual mostraron un alto nivel de actividad física. Por ello, los datos obtenidos durante los primeros 15 minutos no se tuvieron en cuenta para el cálculo del cociente respiratorio ni del gasto energético. Las mediciones se realizaron siempre a las mismas horas del día con el fin de evitar variaciones debidas a los ritmos circadianos. Los datos se capturaron con el programa informático *Power LabChart* (versión 5.0, para el sistema operativo Windows XP, de ADInstruments Inc., EE UU).

A partir de los datos de consumo de O<sub>2</sub> y de producción de CO<sub>2</sub> se calculó:

- Cociente respiratorio (CR), como el cociente entre el volumen de CO<sub>2</sub> producido y el volumen de O<sub>2</sub> consumido. Este parámetro permite conocer los macronutrientes empleados por el animal como fuente de energía. Los valores de CR pueden variar entre 0,7 y 1. Se estima que el valor 0,7 indica un consumo del 100% de lípidos, mientras que el valor 1 se asocia a un consumo del 100% de carbohidratos <sup>140</sup>.
- Gasto energético (REE); se calculó mediante la ecuación de Weir <sup>141</sup> y se refirió a tejido metabólicamente activo <sup>142</sup>:

$$EE \text{ (Kcal/día x peso corporal}^{3/4}\text{)} = \text{Volumen O}_2\text{(mL)} \times 1,44 \times [3,815 + (1,232 \times CR)]$$

Se realizaron tres mediciones a lo largo del período experimental, en las semanas 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> del período experimental.

### 3.6. ACTIVIDAD INTESTINAL

#### 3.6.1. Obtención de vesículas de borde en cepillo

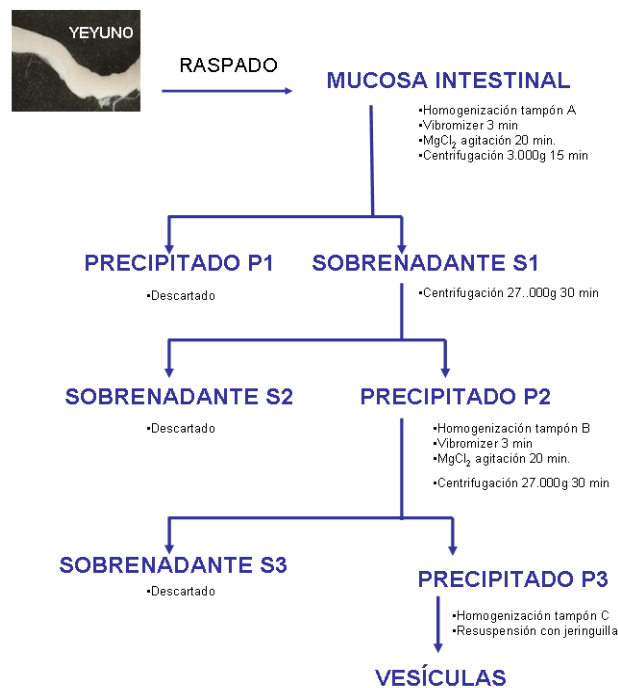
El aislamiento de vesículas de borde en cepillo (VMBC) se realizó basándose en la técnica descrita por Shirazi-Beechey<sup>143</sup>. El procedimiento realizado se detalla a continuación (Figura 3.6):

- Se colocó el yeyuno sobre un portaobjetos y se obtuvo la mucosa mediante raspado. Debido a la poca cantidad de mucosa que se obtiene a partir de yeyuno en ratón, se unificaron las muestras obtenidas de animales del mismo grupo.
- Se añadió tampón A (manitol 100mM, Hepes 2mM; con un pH ajustado a 7,1 con Tris) a razón de 1 ml de tampón por cada gramo de mucosa obtenido.
- Se homogeneizó 3 minutos a 3.000 r.p.m. en un homogeneizador Vibro Mixer RZR1 (Instruments GmbH & Co, Alemania)
- Se filtró en vacío con la ayuda de un embudo Büchner. Se recogió una alícuota de 300µL de la muestra y se congeló a -80°C, para su posterior análisis.
- Al resto de la muestra se le añadió gota a gota  $MgCl_2$  1M (hasta obtener una concentración final de  $MgCl_2$  10 mM) y se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos a 4°C.
- Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3.000g (“Sorvall RC 28S”, Wilmington, Delaware, EE UU, con el rotor SS-34) durante 15 minutos.
- Se descartó el precipitado (P1) obtenido tras esta centrifugación. El sobrenadante (S1) se centrifugó de nuevo, durante 30 minutos a 27.000g (“Sorvall RC 28S” refrigerada, con el rotor SS-34 Sorvall Instruments, Delaware, EE UU).
- Tras esta centrifugación se descartó el sobrenadante (S2).
- El precipitado (P2) se resuspendió en 20 ml de tampón B (Manitol 100mM; Hepes 2mM; sulfato de magnesio 0,1mM y pH ajustado a 7,1 mediante Tris).
- Se homogeneizó 3 minutos en un homogeneizador Vibro Mixer RZR1 (Heidolph Instruments GmbH & Co, Alemania) a 3.000 r.p.m.
- Se añadió gota a gota  $MgCl_2$  1M (hasta obtener una concentración final de 10 mM) manteniéndose en agitación en hielo durante 20 minutos.
- Se centrifugó la muestra en refrigeración ( Sorvall RC 28S), la muestra se sometió a 27.000g durante 30 minutos.

- El precipitado final obtenido (P3) se resuspendió en 500µL de solución tampón C (Manitol 300mM; Hepes 2mM; sulfato de magnesio 0,1mM y pH ajustado a 7,4 mediante Tris) con ayuda de una aguja de 26G, con el fin de ciclar las vesículas obtenidas.
- Se tomaron alícuotas de 100 µL y se congelaron a -80°C para su posterior utilización.

Como control, para confirmar el enriquecimiento de las muestras, se determinó la actividad fosfatasa tanto en las muestras del homogeneizado como en las vesículas de borde en cepillo. Se obtuvieron unos niveles de enriquecimiento en fosfatasa alcalina de entre 7 y 10 veces.

La concentración proteica de las muestras de vesículas de borde en cepillo se cuantificó mediante el método estandarizado de Bradford (ver apartado 3.6.2).



**Figura 3.6.** Esquema del procedimiento seguido para el aislamiento de vesículas de membrana apical a partir de yeyuno de ratón.

### 3.6.2. Determinación de proteína en vesículas de borde en cepillo

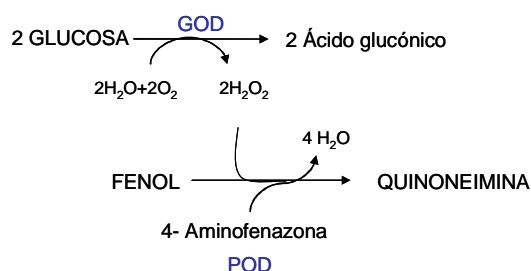
La determinación del contenido proteico se realizó utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE UU), basado en el método Bradford <sup>144</sup>. El colorante empleado en este ensayo es el azul de Coomassie. En solución acuosa, este colorante presenta absorbancia a una longitud de onda de 465nm, sin embargo cuando se produce la unión del colorante a proteínas se produce un cambio de coloración, desplazándose el pico de absorbancia a una longitud de onda de 595nm. La coloración azul de la muestra es proporcional a la cantidad de proteína presente.

La cuantificación de la proteína se realizó mediante lectura de la absorbancia a 595nm y por interpolación de los resultados en una recta patrón de concentración conocida de seroalbúmina bovina (BSA). La recta patrón se realizó a partir de una solución de BSA de 2 mg/mL (Pierce, Thermo, Scientific, Rockford, Illinois, EE UU).

### 3.6.3. Análisis de la actividad de las enzimas sacarasa y maltasa

La actividad de las enzimas sacarasa y maltasa se cuantificó en muestras de vesículas de borde en cepillo, ya que dichas enzimas se localizan en la membrana de borde en cepillo de los enterocitos. La actividad enzimática de estas enzimas se cuantificó según el método descrito por Dahlqvist<sup>145</sup>. Este método determina la cantidad de glucosa liberada como consecuencia de la hidrólisis de los sustratos sacarosa y maltosa respectivamente.

Tras la hidrólisis de los sustratos, la glucosa se determinó mediante una reacción colorimétrica. La glucosa libre presente en la muestra es oxidada por la enzima glucosa oxidasa (GOD), produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido, en presencia de peroxidasa (POD) reacciona con fenol y 4-aminofenazona dando lugar a un complejo coloreado de quinoneimina (Figura 3.7). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Para la determinación de glucosa se utilizó el reactivo *Randox GlucosE GLUC/PAP* (Randox Laboratories Ltd., Crumlin Co, ANTRIM, Reino Unido).



**Figura 3.7.** Esquema de la reacción colorimétrica mediante la cual se detecta la presencia de glucosa libre.

La determinación de la actividad de enzimas disacaridasas se realizó siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Las soluciones utilizadas como sustrato fueron:

- Sustrato sacarosa: solución 116mM de sacarosa en *buffer* de maleato sódico (0,1 M y pH 6).
- Sustrato maltasa: solución 27,77 mM de maltosa en *buffer* de maleato sódico (0,1M y pH 6).

A continuación se describe la metodología empleada:

- Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras de vesículas de borde en cepillo (muestras obtenidas según el procedimiento detallado en el apartado 3.6.1) y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del tampón disacárido (sacarosa o maltosa, para el estudio de actividad sacara y maltasa respectivamente). En el caso del blanco se añadió 100  $\mu\text{L}$  de muestra de vesículas de borde en cepillo y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de agua.
- Se incubó durante 30 minutos a 37° C en agitación constante.
- Tras la incubación se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se le añadió 1000  $\mu\text{L}$  del reactivo GOD-PAP.
- Se incubaron las muestras con el reactivo durante 10 minutos a 37°C en agitación constante.
- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 500nm.

La concentración de glucosa se calculó comparando los valores de absorbancia respecto de una recta patrón. Los resultados se refirieron como actividad enzimática específica y se expresaron como ( $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/mg proteína\*min.)

### 3.6.4. Análisis de la actividad de enzimas aminopeptidasa-N y dipeptidilpeptidasa-IV

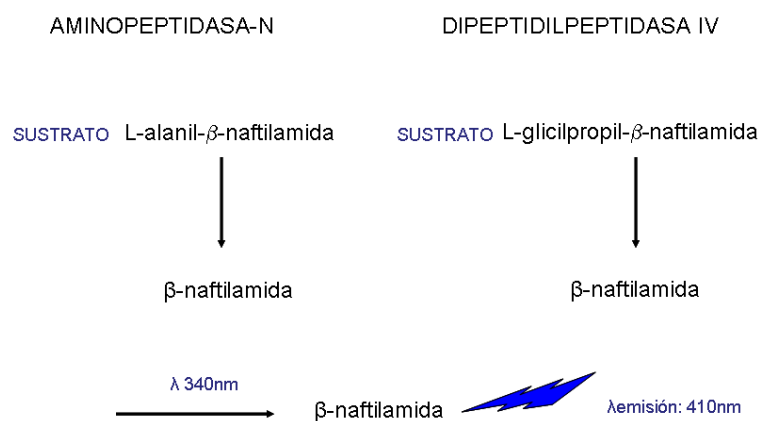
La actividad de las enzimas aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV se cuantificó en muestras de vesículas de borde en cepillo, obtenidas según el procedimiento detallado en el apartado 3.6.1. La determinación de la actividad de estas enzimas se realizó mediante la detección de  $\beta$ -naftilamida mediante fluorimetría. La  $\beta$ -naftilamida se liberó como consecuencia de la acción de la aminopeptidasa-N y dipeptidilpeptidasa-IV sobre los sustrato L-alanil- $\beta$ -naftilamida y L-glicilpropil-  $\beta$ -naftilamida, respectivamente <sup>146</sup> (Figura 3.8). Se prepararon con antelación los siguientes reactivos:

| Reactivo                        | Preparación   |
|---------------------------------|---|
| Sustratos                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Solución 3,6mM de L-alanil-<math>\beta</math>-naftilamida en una solución de dimetilformamida.</li> <li>Solución 3,6mM de L-glicilpropil-<math>\beta</math>-naftilamida en una solución de dimetilformamida.</li> </ul>  |
| Tampón fosfatos                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Solución 0,5M de fosfato potásico diácido (<math>H_2KPO_4</math>, Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España)</li> <li>Solución 0,5M de difosfato potásico monoácido (<math>HK_2PO_4</math> Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España)</li> <li>Se toman 4 ml de la solución 0,5M de fosfato potásico diácido y 16 ml de la solución 0,5M de bifosfato potásico monoácido llevándose a un volumen de 100 ml con agua destilada y ajustándose el pH a 7,5. La solución se guarda a 4°C.</li> </ul> |
| Solución STOP glicina:          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Solución 50 mM de glicina y pH 10,4. Se mantiene a 4°C.</li> </ul>   |
| Patrón de $\beta$ -naftilamida: | <ul style="list-style-type: none"> <li>Solución de <math>\beta</math>-naftilamida a una concentración 0,17mM. La preparación se guarda en frasco topacio a 4°C.</li> </ul>  |

La determinación se realizó siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de sustrato (L-alanil- $\beta$ -naftilamida o de L-glicilpropil- $\beta$ -naftilamida, en función de la enzima en estudio), y 700  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato.
- La solución resultante se incubó durante 5 minutos a 37°C.
- Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras de vesículas de borde en cepillo (muestras obtenidas según el procedimiento detallado en el apartado 3.6.1) a los tubos. Al tubo de referencia (“blanco”) se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada en lugar de muestra.
- Se incubó durante 30 minutos a 37°C.
- Se añadió 1,5 mL de solución Stop Glicina a todos los tubos.
- Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada a los tubos con la muestra y 100  $\mu\text{L}$  de muestra al tubo “blanco”.
- Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la fluorescencia en cubeta de cuarzo; siendo 340 nm la longitud de excitación y 410 nm la de emisión.

La concentración de  $\beta$ -naftilamida se calculó en función de una recta de calibrado. Las muestras se analizaron por triplicado.



**Figura 3.8.** Esquema de la hidrólisis de los sustratos L-alanil- $\beta$ -naftilamida y L-glicilpropil- $\beta$ -naftilamida por acción de la aminopeptidasa-N y la dipeptidilpeptidasa IV, y su posterior detección mediante fluorimetría.



### 3.6.5. Expresión de los transportadores SGLT-1 y PEPT-1

Mediante la técnica Western blot se analizó el nivel de expresión de los transportadores de membrana SGLT-1 y PEPT-1, ambos localizados en la membrana apical de enterocitos. Este análisis se realizó en muestras de vesículas de borde en cepillo (obtenidas según el apartado 3.6.1).

Se procedió como se detalla a continuación:

- Se cargaron 25 µg de proteína en cada pocillo (cuantificadas por el método Bradford, ver apartado 3.4.2) de un gel de poliacrilamida al 12% (p/v) y se realizó una electroforesis con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) mediante el sistema Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, California EE UU), usando como condiciones de desarrollo: 20mA y 100V los primeros 30 minutos y 60mA y 200V durante otros cuarenta minutos.
- Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas desde el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE. UU) por electrotransferencia mediante el sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, California EE UU) usando como condiciones de transferencia: 400mA, 100V durante 1 hora.
- Se incubaron las membranas con una solución de leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-Tween al 1x durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente, con el fin de eliminar uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana.
- Se realizaron dos lavados de 5 minutos con TBS-Tween 1x.
- A continuación se incubaron las membranas durante 16 horas a 4°C con una solución de anticuerpos primarios PEPT-1, SGLT-1,  $\beta$ -actina diluidos en TBS-Tween 1x con leche desnatada al 1% (p/v). Los anticuerpos y las diluciones empleadas se muestran en la Tabla 3.1.
- Tras la incubación se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 1x. Un primer lavado de 15 minutos y dos lavados más de 5 minutos cada uno.
- Una vez lavadas las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Goat anti-rabbit IgG.HRP*) durante 1 hora a temperatura ambiente, el anticuerpo empleado así como su concentración se muestra en la Tabla 3.3.
- Tras la incubación se realizaron nuevamente tres lavados con TBS-Tween 1x (un lavado de 15 minutos y dos lavados más de 5 minutos cada uno).

- La membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EE. UU). Tras la incubación se reveló sobre película de radiografía Hyperfilm TM MP, (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las películas radiográficas se revelaron en una máquina de revelado Curix 60 (Agfa HealthCare NV. Mortsel, Bélgica).
- Se cuantificaron las bandas mediante densitometría utilizando el software Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE. UU). La cantidad de proteínas PEPT-1, SGLT-1, se indican de forma relativa a la proteína  $\beta$ -actina.

**Tabla 3.3.** Anticuerpos utilizados para el análisis de transportadores de membrana

| Tipo       | Anticuerpos                  | Especie | Casa comercial | Dilución empleada |
|------------|------------------------------|---------|----------------|-------------------|
| Primario   | PEPT-1 (H-235)               | Conejo  | Santa Cruz     | 1:500             |
|            | SGLT-1 (H-85)                | Conejo  | Santa Cruz     | 1:500             |
|            | $\beta$ -actina (PA1-21167). | Conejo  | Thermo         | 1:500             |
| Secundario | Goat anti-rabbit IgG.HRP     | Conejo  | Santa Cruz     | 1:2500            |

### 3.7. EXPRESIÓN DE GENES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

#### 3.7.1. Detección de mRNA por qPCR arrays

El nivel de expresión de genes relacionados con la vía de señalización Wnt se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real en *arrays* de PCR. La realización de este estudio consta de varias fases, las cuales se detallan a continuación.

##### 3.7.1.1. Extracción de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de muestras de colon distal de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se tomaron 45 mg de tejido y se homogenizó mediante la utilización de micropistilos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (manteniendo la muestra congelada).
- La extracción de ARN se realizó utilizando el kit *Illustra RNAspin Mini RNA isolation* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los pasos se realizaron en tubos de 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), previamente tratados con DEPC (Sigma, Tres Cantos, Madrid, España).

- La concentración de ARN se determinó midiendo la absorción a una longitud de onda de 260 nm utilizando un espectrofotómetro *Picodrop Microtitre* (Picodrop, Saffron Walden, Reino Unido). Además, se realizó la medición de la absorbancia a 280 nm para calcular la pureza de la muestra mediante la siguiente expresión:

$$R = \text{Abs } 260\text{nm} / \text{Abs } 280\text{nm}$$

Todas las muestras obtenidas presentaron valores de R en el rango  $1,8 < R < 2,1$ , estos valores son indicativos de un alto grado de pureza de la muestra en ARN.

### 3.7.1.2. Retrotranscripción

El ARN extraído, a partir de las muestras de colon (extracción realizada siguiendo el apartado 7.1.1), se retrotranscribió a ADNc mediante la utilización del *kit First RT<sup>2</sup> First Strand* (SABioscience, Frederick, Maryland, EE UU), de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante.

### 3.7.1.3. qPCR arrays

El estudio de expresión de genes de la vía WNT se realizó por qPCR a tiempo real en *arrays* de PCR empleando el sistema *RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR array de Superarray* (Wnt Signaling Pathway Array (SA Biosciences, Frederick, Maryland, EE UU). A continuación se describe brevemente el protocolo utilizado:

- Se preparó una mezcla de reacción que contenía 1µg de ADNc y el fluorocromo SYBR Green.
- Se añadieron 25 µl de esta mezcla a cada pocillo de la placa de PCR *array*. En los pocillos de la placa comercial se encuentran los cebadores necesarios para la amplificación de los diferentes genes de interés.
- La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 equipado con cabezal de detección continua de fluorimetría Chromo 4 (MJ Research, Waltham, Massachusetts, EE. UU). Las condiciones en las que se realizó la PCR se muestran en la Tabla 3.4.
- En cada ciclo de PCR se registró la fluorescencia emitida a 72°C.
- Los datos obtenidos se analizaron con el programa *Opticon Monitor 2 V 2.03* (MJ Research, Waltman, Massachusetts, EE UU).
- La expresión de los genes se cuantificó de forma relativa mediante comparación con la de

los genes constitutivos *Gusb*, *Hprt*, *Hsp90ab1*, *Gapdh* y *Actb* empleando la técnica de los  $\Delta C_t$ <sup>147</sup>.

**Tabla 3.4.** Condiciones en que se desarrolló la PCR a tiempo real.

| Proceso                   | Temperatura (°C) | Tiempo      | Ciclos |
|---------------------------|------------------|-------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95               | 10 minutos  | 1      |
| Desnaturalización         | 95               | 15 segundos | 40     |
| Emparejamiento            | 55               | 30 segundos |        |
| Extensión                 | 72               | 30 segundos |        |

### 3.7.2. Detección de $\beta$ -catenina mediante la técnica Western blot

Los niveles de expresión de la proteína  $\beta$ -catenina en muestras de colon distal se analizaron por Western blot. Este análisis se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- Se tomaron muestras de 50 mg de colon distal.
- Las muestras de tejido se homogeneizaron mediante la utilización de micropistilos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y *RIPA Lysis Buffer* (Sigma-Aldrich, Madrid, España) con inhibidor de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Durante el proceso se mantuvo la muestra congelada.
- Se incubó durante 30 minutos a 4°C.
- Se centrifugó la muestra a 10.000g durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante.
- Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína en cada pocillo (muestras cuantificadas por Bradford, apartado 3.6.2) de un gel de poliacrilamida al 12% (p/p) y se realizó una electroforesis con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en un sistema Mini-Protean® 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE UU), usando como condiciones: (20mA y 100V los primeros 30 minutos y 60mA y 200V durante otros cuarenta minutos).
- Después de la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE. UU) mediante electrotransferencia en un sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE UU), en las siguientes condiciones: 400mA, 100V durante 1 hora.

- Se incubaron las membranas con una solución de leche desnatada al 5% (p/v) en *TBS-Tween* al 1x durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente, con el fin de eliminar uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana.
- Se realizaron dos lavados de 5 minutos con *TBS-Tween* 1x.
- A continuación se incubaron las membranas durante 16 horas a 4°C con una mezcla de anticuerpos primarios anti  $\beta$ -catenina y anti  $\beta$ -actina (PA1-21167) diluidos en *TBS-Tween* 1x con leche desnatada al 1% (p/v). Los anticuerpos y las diluciones empleadas se muestran en la Tabla 3.4.
- Tras la incubación se realizaron 3 lavados con *TBS-Tween* 1x. Un primer lavado de 15 minutos y dos lavados más de 5 minutos cada uno.
- Una vez lavadas las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Goat anti-rabbit IgG.HRP*) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo empleado así como su concentración se muestra en la Tabla 3.5.
- Tras la incubación se realizaron nuevamente tres lavados con *TBS-Tween* 1x (un lavado de 15 minutos y dos lavados más de 5 minutos cada uno).
- Se incubaron las membranas durante 5 minutos con el substrato *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo, Scientific, Rockford, Illinois, EE UU). Tras la incubación se reveló sobre película de radiografía *Hyperfilm<sup>TM</sup> MP*, (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las películas radiográficas se revelaron en una máquina de revelado *Curix 60* (Agfa HealthCare NV. Mortsel, Bélgica)
- La cuantificación de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software *Quantity One Software* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE. UU). La cantidad de proteína  $\beta$ -catenina se indica de forma relativa a la proteína  $\beta$ -actina.

**Tabla 3.5.** Anticuerpos utilizados para la detección de  $\beta$ -catenina

| Tipo       | Anticuerpos                     | Especie | Casa comercial | Dilución empleada |
|------------|---------------------------------|---------|----------------|-------------------|
| Primario   | $\beta$ -catenina (ABE208)      | Conejo  | MERCK          | 1:500             |
|            | $\beta$ -actina (PA1-21167).    | Conejo  | THERMO         | 1:500             |
| Secundario | <i>Goat anti-rabbit IgG.HRP</i> | Conejo  | Santa Cruz     | 1:2500            |

### 3.8. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DE GENES

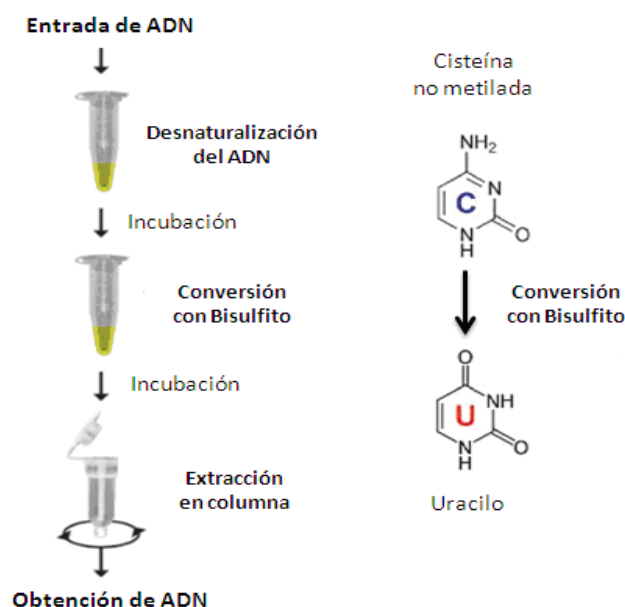
El estado de metilación de los genes *Apc* y *Fbxw4* se determinó mediante el método de modificación de ADN por bisulfito sódico. La elección de estos genes se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de expresión de genes de la vía WNT. El tratamiento del ADN con bisulfato sódico provoca la conversión de las citosinas (C) no metiladas en uracilo (U). Con el ADN tratado con bisulfito sódico se realiza PCR específica de metilación.

#### 3.8.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico a partir de muestras de colon distal se realizó mediante el kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, Wisconsin, EE UU), siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### 3.8.2. Tratamiento con bisulfito

Se trató el ADN con bisulfito sódico utilizando el *kit EZ DNA Methylation-Gold Kit™* (Zymo Research Corporation, Irvine, California, EE UU) según las instrucciones del fabricante. El proceso de tratamiento con bisulfito se muestra brevemente en la Figura 3.9.



**Figura 3.9.** Esquema del proceso de tratamiento del ADN con bisulfito mediante el kit *EZ DNA Methylation-Gold Kit™* (Zymo Research).

### 3.8.3. Diseño de cebadores

Se obtuvieron las secuencias de los genes *Apc* y *Fbxw4* en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (disponible en la dirección URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir de la secuencia de cada uno de los genes en estudio se diseñaron los cebadores específicos para realizar la PCR específica de metilación utilizando el software de diseño de cebadores *Meth Primer* de UROGENE (disponible en el sitio web: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). Este software localiza las regiones de la secuencia en la que se encuentran islas CpG y diseña cebadores para la amplificación de dichas regiones.

### 3.8.4. Análisis de metilación por PCR específica de metilación

Para la realización de las PCR específicas de metilación se utilizó el ADN extraído según las condiciones expuestas anteriormente y tratado con bisulfito sódico. Como control de ADN metilado se utilizó el *Universal Methylated DNA Standard* (Zymo Research Corporation, Irvine, California, EE UU) tratado con bisulfito sódico. El ADN empleado como control de ADN no metilado se obtuvo a partir de muestras de colon proximal de un animal del grupo control cepa salvaje siguiendo el proceso que se detalla en el anexo II y posteriormente tratado con bisulfito sódico

#### 3.8.4.1. Análisis de metilación del gen *Apc*

Las reacciones de PCR con cada una de las parejas de cebadores se realizaron en un volumen de 25 µL de acuerdo a la Tabla 3.6. Los cebadores utilizados para la realización de las reacciones de PCR específica de metilación para el gen *Apc* se muestran en la Tabla 3.7. Las condiciones en las que se realizaron las reacciones de PCR para la amplificación de ADN metilado y no metilado se muestran en las Tablas 3.8 y 3.9 respectivamente.

**Tabla 3.6.** Composición de la mezcla para usar en la técnica PCR

| Reactivo                   | Volumen      |
|----------------------------|--------------|
| dH <sub>2</sub> O          | 13,3 µL      |
| Buffer 10X                 | 2,5 µL       |
| Mg <sup>2+</sup>           | 1 µL         |
| Dntp (5µM)                 | 1 µL         |
| Cebador sentido (5 µM)     | 1 µL         |
| Cebador antisentido (5 µM) | 1 µL         |
| AmpliTaQ Gold              | 0,2 µL       |
| ADN                        | 5 µL (150ng) |
| Total                      | 25 µL        |

**Tabla 3.7.** Cebadores empleados para la amplificación de ADN metilado y no metilado del gen Apc

| CEBADOR         | ADN                          |                             |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
|                 | METILADO                     | NO METILADO                 |
| Sentido (F)     | 5'GTAGAGGTAGGGTATAGGTTGTCTGC | 5'TAGAGGTAGGGTATAGGTTGTTGTG |
| Antisentido (R) | 5'CCATCTTATTAAAAACGAAAAACGA  | 5'CATCTTATTAAAAACAAAAACAAA  |

**Tabla 3.8.** Condiciones de la técnica PCR para el análisis del ADN metilado

| Proceso                   | Temperatura | Tiempo      | Ciclo |
|---------------------------|-------------|-------------|-------|
| Desnaturalización Inicial | 95 °C       | 10 minutos  | 1     |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 1 minuto    | 39    |
| Emparejamiento            | 62 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión                 | 72 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión final           | 72 °C       | 10 minutos  | 1     |



**Tabla 3.9.** Condiciones de la técnica PCR para el análisis de ADN no metilado

| Proceso                   | Temperatura | Tiempo      | Ciclo |
|---------------------------|-------------|-------------|-------|
| Desnaturalización Inicial | 95 °C       | 10 minutos  | 1     |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 1 minuto    | 8     |
| Emparejamiento            | 61 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión                 | 72 °C       | 45 segundos |       |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 1 minuto    | 31    |
| Emparejamiento            | 60 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión                 | 72 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión final           | 72 °C       | 10 minutos  | 1     |

#### 3.8.4.2. Análisis de metilación del gen *Fbxw4*

Las reacciones de PCR con cada una de las parejas de cebadores se realizaron en un volumen de 25 µl de acuerdo a las condiciones que se muestran en la Tabla 3.10. Los cebadores utilizados para la realización de las reacciones de PCR específica de metilación para el gen *Fbxw4* se muestran en la Tabla 3.11. Las condiciones en las que se realizaron las reacciones de PCR para la amplificación de ADN metilado y no metilado se muestran en las Tablas 3.12.

**Tabla 3.10.** Composición de la mezcla para usar la técnica de PCR

| Reactivo           | Volumen      |
|--------------------|--------------|
| dH <sub>2</sub> O  | 13,3 µl      |
| Buffer 10X         | 2,5 µl       |
| Mg <sup>2+</sup>   | 1 µl         |
| dNTP (5µM)         | 1 µl         |
| Sentido (5 µM)     | 1 µl         |
| Antisentido (5 µM) | 1 µl         |
| AmpliTaq Gold      | 0,2 µl       |
| Total              | 20 µl        |
| ADN                | 5 µl (150ng) |

**Tabla 3.11.** Cebadores empleados para la amplificación de ADN metilado y no metilado del gen Fbxw4

| CEBADOR     | ADN                          |                             |
|-------------|------------------------------|-----------------------------|
|             | METILADO                     | NO METILADO                 |
| Sentido     | 5'GTTTCGTATTTTCGAAATATAGGCGT | 5'GGGGTTTGTATTTTGAAATATAGGT |
| Antisentido | 5'TAACTACTCATAAACGACCGCG     | 5'CTAACTACTCATAAACAACCACAAA |

**Tabla 3.12.** Condiciones de la técnica de PCR para el análisis de ADN metilado y no metilado.

| Proceso                   | Temperatura | Tiempo      | Ciclo |
|---------------------------|-------------|-------------|-------|
| Desnaturalización Inicial | 95 °C       | 10 minutos  | 1     |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 1 minuto    | 39    |
| Emparejamiento            | 63 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión                 | 72 °C       | 45 segundos |       |
| Extensión final           | 72 °C       | 10 minutos  | 1     |

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos en el presente estudio se sometieron a un análisis descriptivo (media, desviación estándar y coeficiente de variación). El peso de los órganos se analizó mediante un análisis inferencial basado en un ANCOVA de un factor, utilizando el peso corporal como covariable. Las diferencias entre medias se detectaron mediante una prueba múltiple *a posteriori* Tuckey B.

Para el estudio de las diferencias en el número de lesiones de la mucosa y en el nivel de expresión de los genes analizados se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, seguido de pruebas *a posteriori* U de Mann Whitney. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas a un nivel de  $P < 0.05$ .

Todos los análisis estadísticos citados anteriormente se realizaron con el programa informático SPSS 21.0 para el sistema operativo *Windows* (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY, EE UU).

Los datos del metabolismo energético se sometieron a un análisis inferencial, basado en un ANOVA, para evaluar los efectos atribuibles al tipo de tratamiento. Este análisis se fundamentó en un modelo lineal de 2 factores anidados. Para detectar las diferencias entre los tratamientos, se aplicó una prueba *a posteriori* Tuckey B. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas a un nivel de  $P < 0.05$ . Estos análisis se realizaron con el programa informático MINITAB (versión 15 para el sistema operativo Windows, Inc., State College, PA, EE UU).

Los datos de sangre oculta en heces se analizaron mediante un análisis de correspondencia, con el fin de detectar relación entre variables categóricas (grupos experimentales e intensidad de sangrado). Este método permite el análisis de datos cualitativos en formato gráfico. Antes de realizar el análisis de correspondencia, los datos se introdujeron en una tabla de contingencia. Este análisis se realizó con el programa informático SPAD (version 7.3 para el sistema operativo Windows, Cocheris, Suresnes, Francia).



## 4). Resultados

---

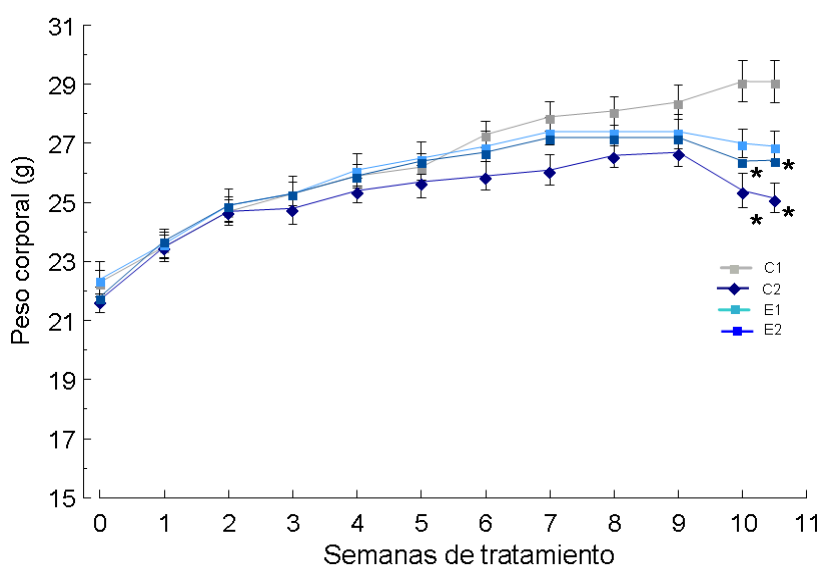


## 4.1. EFECTOS A NIVEL SISTÉMICO

Algunos de los signos asociados al cáncer colorrectal son la pérdida de peso corporal, las alteraciones del metabolismo energético y las anomalías de órganos y tejidos <sup>70</sup>. En el caso particular de los ratones APC<sup>Min/+</sup>, además de tales manifestaciones, se aprecian multitud de tumores en el tracto gastrointestinal, lesiones preneoplásicas en la mucosa de colon y sangrado intestinal <sup>148,149</sup>. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudió el efecto de las dietas suplementadas sobre el peso corporal de los animales, el peso de diferentes órganos y tejidos adiposos, la microbiota intestinal, el sangrado intestinal y el estado de la mucosa de colon.

### 4.1.1. Evolución del peso corporal

El análisis de la curva de crecimiento de los cuatro grupos experimentales (Figura 4.1), mostró un menor crecimiento corporal de los animales APC<sup>Min/+</sup> respecto de la cepa salvaje (C1). Durante las nueve primeras semanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal de los diferentes grupos experimentales. Tomando como referencia el grupo cepa salvaje (C1), es a partir de la décima semana cuando se registraron diferencias significativas en los grupos APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta control (C2,  $P=0,001$ ) y dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2,  $P=0,049$ ).



**Figura 4.1.** Evolución del peso corporal en los cuatro grupos experimentales del estudio (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan en gramos como *media ± error típico*.

\*Diferencias significativas respecto del grupo C1 ( $P \leq 0,05$ ).

Analizando con más detalle la evolución del peso corporal en los diferentes grupos de animales APC<sup>Min/+</sup>, se observa que el grupo alimentado con la dieta control (C2) presentaron menor ganancia de peso a partir de la segunda semana del período experimental. Sin embargo, los ratones de los grupos APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) mantuvieron niveles de crecimiento similares al grupo cepa salvaje (C1) hasta la sexta semana del período experimental. A partir de este momento, todos los grupos APC<sup>Min/+</sup> presentaron menor peso corporal que el grupo cepa salvaje (C1). Además, cabe destacar que, a pesar de que todos los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> presentaron pérdida de peso corporal en la fase final del período experimental, dicha pérdida se vio atenuada en los grupos alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2).

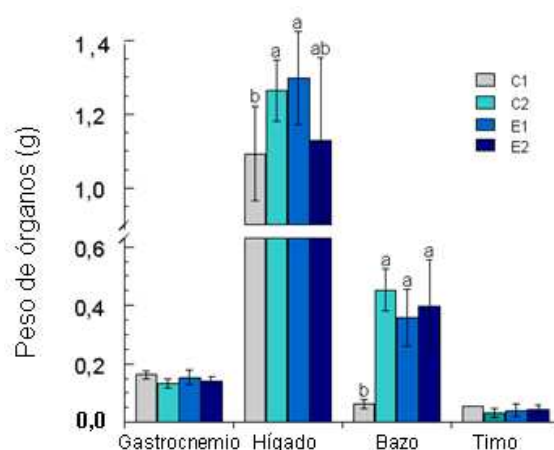
#### 4.1.2. Pesos de órganos

A nivel de órganos, las alteraciones más significativas se detectaron en el bazo y el hígado, observándose un incremento de peso en los grupos APC<sup>Min/+</sup> (Figura 4.2).

Al final del período experimental se apreció un importante incremento del tamaño del bazo, así como un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del peso del órgano en todos los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> respecto del grupo cepa salvaje (C1). Considerando únicamente los ratones APC<sup>Min/+</sup>, el peso del bazo fue menor en los alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) que en los mantenidos con dieta control (C2). No obstante, el efecto de las dietas suplementadas no fue estadísticamente significativo.

En comparación con el grupo cepa salvaje (C1), el peso del hígado fue significativamente mayor en los grupos APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control (C2) y la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (E1). Los datos indican que la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2) reduce el incremento de peso del hígado en los animales APC<sup>Min/+</sup>, no presentando diferencias significativas con el resto de grupos experimentales. Por su parte, no se registraron diferencias significativas en los pesos del músculo gastrocnemio ni en el peso del timo.



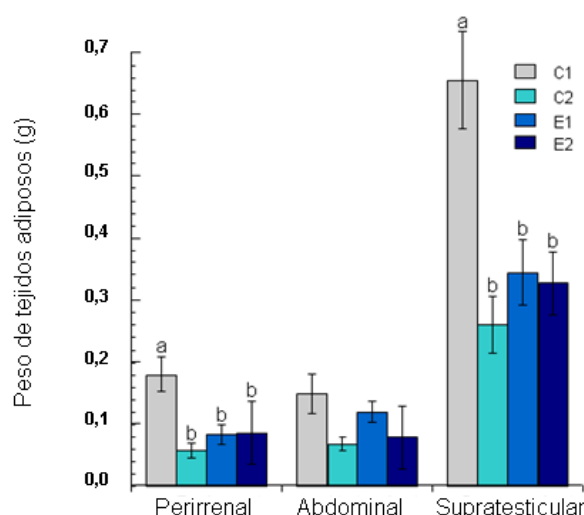


**Figura 4.2.** Comparación de los pesos de los órganos analizados en los cuatro grupos experimentales del estudio (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan en gramos, como *media*  $\pm$  *desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3. Pesos de los depósitos grasos

Con carácter general, se apreció una disminución del peso en la totalidad de los depósitos grasos, en los grupos de ratones APC<sup>Min/+</sup>. En estos grupos la reducción de tejido adiposo fue más acentuada en los animales alimentados con la dieta control (C2) que en aquellos alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2), a pesar de no detectarse una mejora estadísticamente significativa (Figura 4.3).

El peso de los depósitos grasos perirrenal y supratesticular se redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en los animales APC<sup>Min/+</sup> respecto del grupo cepa salvaje (C1). El tejido graso abdominal no presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos, a pesar de que se redujo en los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup>.



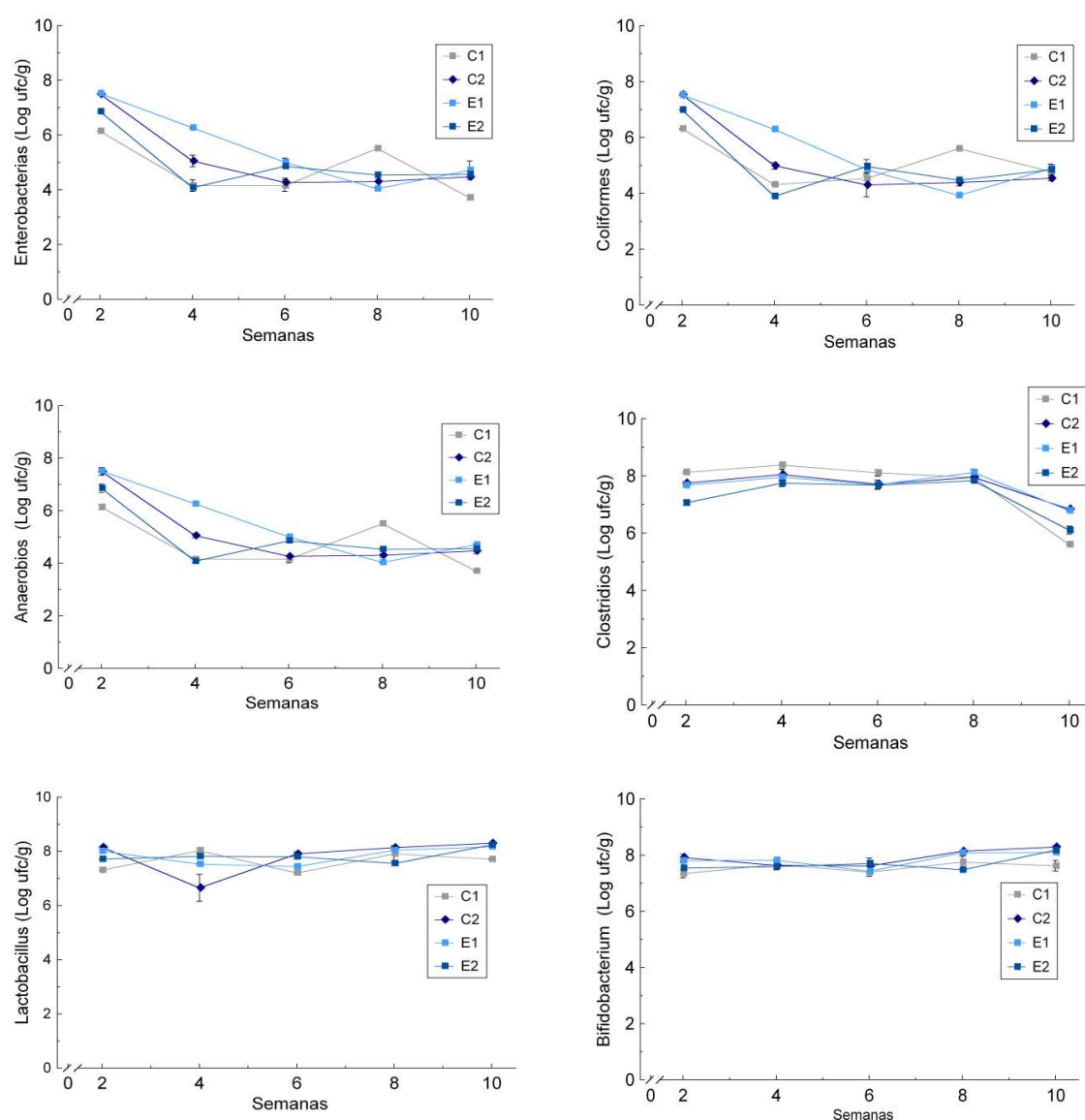
**Figura 4.3.** Comparación del peso de los depósitos grasos en los cuatro grupos experimentales del estudio (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se muestran en gramos, como *media*  $\pm$  *desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.4. Efectos sobre la microbiota intestinal

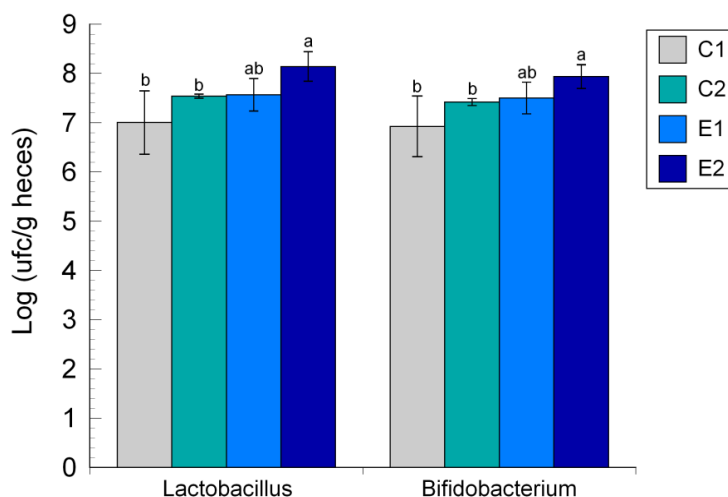
El efecto de las dietas suplementadas sobre la composición de la microbiota intestinal se analizó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias de diferentes familias de bacterias en heces. Se efectuaron recuentos microbiológicos de: enterobacterias, bacterias coliformes, bacterias anaerobias, clostridios, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2 de material y métodos. Los resultados de los recuentos microbiológicos se muestran en la Figura 4.4.

No se observaron diferencias significativas en los recuentos de unidades formadoras de colonias en heces a lo largo del período experimental en ninguna de las familias de bacterias analizadas. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en los recuentos realizados en heces, por lo que la alimentación con dietas suplementadas no modifica el número de unidades formadoras de colonias presentes en las heces.

Además del recuento de bacterias realizado en muestras de heces obtenidas a lo largo del período de experimentación, se realizaron recuentos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* a partir del contenido del colon que se recogió tras el sacrificio. Estos recuentos mostraron que la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2) provocó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del número de unidades formadoras de colonias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en el contenido del ciego, en comparación con los grupos C1 y C2 (cepa salvaje y APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta control respectivamente). Por su parte, la dieta suplementada únicamente con *Bf* y *Lg* (E1) no presentó diferencias significativas con ningún grupo (Figura 4.5.).



**Figura 4.4.** Resultados de los recuentos de bacterias en muestras fecales que se obtuvieron a lo largo del período experimental. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan en Log ufc/g, como *media*  $\pm$  *desviación estándar*.



**Figura 4.5.** Resultados de los recuentos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en muestras fecales obtenidas de ciego tras el sacrificio. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan en (Log ufc/g) como *media ± desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.5. Histología de colon

##### 4.1.5.1. Recuento de lesiones

La detección de lesiones en la mucosa de colon se realizó mediante análisis histológico de muestras de colon teñidas con azul de metileno, tal y como se describe en el apartado 3.3.1 de material y métodos. En este caso hay que destacar que los focos de criptas aberrantes detectados en los ratones APC<sup>Min/+</sup> no presentaron abultamiento de los bordes, como es típico en este tipo de lesiones. Estas diferencias morfológicas respecto de la lesión clásica se describe en la bibliografía científica, de tal modo que los focos de las criptas aberrantes observados en animales APC<sup>Min/+</sup> se denominan ACF<sup>Min</sup> 138. La Figura 4.6, que recoge las microfotografías de la mucosa de colon procedentes de ratones de los cuatro grupos experimentales, permite apreciar los diferentes tipos de lesiones.

Como cabía esperar, no se observaron lesiones en la mucosa del colon obtenida de los animales del grupo cepa salvaje (C1). Sin embargo, en todas las muestras de colon de los grupos de ratones APC<sup>Min/+</sup> se detectó la presencia de focos de criptas aberrantes, y en algunas de las muestras se apreciaron adenomas. La alimentación de los ratones APC<sup>Min/+</sup> con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el número de focos de criptas aberrantes en comparación con el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2).

A pesar de disminuir el número de focos de criptas aberrantes, en los animales alimentados con las dietas suplementadas no se redujo la incidencia de este tipo de lesiones (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Incidencia y recuento del número de focos de criptas aberrantes (ACF) en colon completo (n=4) de los cuatro grupos experimentales (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se muestran como *media ± desviación estándar* (n=4 animales por grupo). Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

| Grupo | Incidencia (%) | Nº ACF / animal    | SD   |
|-------|----------------|--------------------|------|
| C1    | 0              | 0 <sup>c</sup>     | 0,00 |
| C2    | 100            | 17,75 <sup>a</sup> | 4,27 |
| E1    | 100            | 9,75 <sup>b</sup>  | 4,27 |
| E2    | 100            | 7,50 <sup>b</sup>  | 2,51 |

El análisis de los datos correspondientes al recuento de adenomas en colon (Tabla 4.2.) indica que la alimentación de animales APC<sup>Min/+</sup> con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina tiende a reducir la incidencia de este tipo de lesiones, así como el número de las mismas.

Debido al bajo número de adenomas detectados, y al tamaño muestral reducido, estos datos muestran únicamente una tendencia. Habría sido necesario incrementar el tamaño muestral para establecer la existencia o no de diferencias significativas.

**Tabla 4.2.** Incidencia y recuento del número de adenomas en colon completo de los cuatro grupos experimentales del estudio (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se muestran como *media ± desviación estándar* (n=4 animales por grupo).

| Grupo | Incidencia (%) | Nº adenomas / animal | SD   | Nº adenomas / Grupo |
|-------|----------------|----------------------|------|---------------------|
| C1    | 0              | 0,00                 | 0,00 | 0                   |
| C2    | 75             | 1,25                 | 1,25 | 5                   |
| E1    | 50             | 0,50                 | 0,25 | 2                   |
| E2    | 25             | 0,25                 | 0,50 | 1                   |

Con carácter general se observó que la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2) redujo en mayor medida el número de lesiones en la mucosa de colon, sin embargo no se observaron diferencias significativas respecto de la dieta suplementada únicamente con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (E1).

#### 4.1.5.2. Análisis de los cortes histológicos de colon

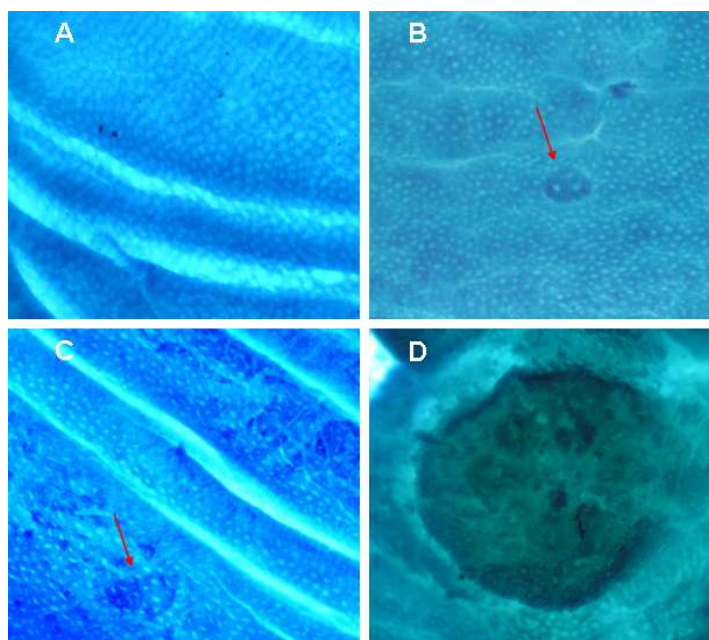
Las alteraciones histológicas de la mucosa de colon se analizaron mediante el estudio de cortes histológicos de colon, obtenidos según se detalla en el apartado 3.3.2 de material y métodos. Los cortes histológicos de colon de animales de la cepa salvaje (C1) mostraron una mucosa con morfología normal, observándose las criptas de Lieberkühn como estructuras bien definidas y de tamaño regular. En la parte superior de la mucosa se apreció la existencia de una capa de mucinas producidas por la secreción de células caliciformes (Figura 4.7, A).

La histología del colon de ratones del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) mostró la existencia de displasia a nivel de la mucosa. Las criptas de Lieberkühn mostraron unas estructuras de tamaño incrementado y de forma irregular. Además, la capa de mucinas se reduce de forma considerable, llegando a desaparecer completamente en algunas regiones (fig 4.7, B).

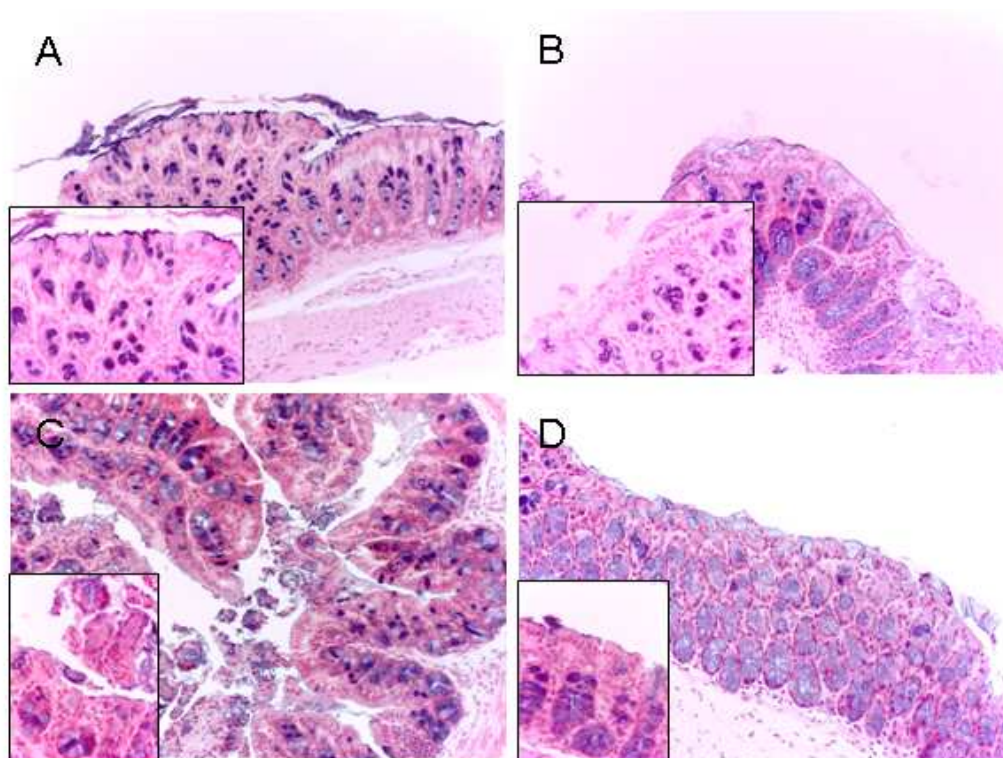
Los cortes histológicos realizados en muestras de colon procedentes de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (E1) manifestaron alteraciones morfológicas en la mucosa de colon. En este sentido, al igual que en el grupo control APC<sup>Min/+</sup> (C2), se observó un incremento del tamaño de las criptas de Lieberkühn, así como disminución de la capa de mucinas. El único cambio destacable es la recuperación parcial de la capa de mucinas (Figura 4.7, C).

El estudio histológico del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2) mostró criptas de Lieberkühn irregulares y de un tamaño mayor al normal. Sin embargo, se observó una mejoría en cuanto a la integridad de la mucosa, recuperándose en gran medida la capa de mucinas, aunque ésta siguió siendo inferior a la observada en animales de la cepa salvaje (C1) (Figura 4.7, D).





**Figura 4.6.** Fotografías de mucosa de colon; A: mucosa sana, B: foco de criptas aberrantes clásicas (ACF), C: foco de criptas aberrantes en ratones  $APC^{Min}$  ( $AFC^{Min}$ ), D: adenoma. Las imágenes fueron tomadas a 40 aumentos



**Figura 4.7.** Fotografías de cortes histológicos con tinción hematoxilina-eosina de muestras de colon representativas de cada grupo experimental. A: cepa salvaje alimentado con dieta control (C1); B:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control (C2); C:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de Bf y Lg (E1); D:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de Bf, Lg y quercetina (E2). Las imágenes se tomaron a 20x (recuadro inferior izquierdo, aumento del epitelio 63x).





#### 4.1.6. Sangrado intestinal

El sangrado intestinal es un signo que se asocia a varios tipos de enfermedades intestinales, entre las que se encuentra el cáncer colorrectal. El sangrado intestinal asociado al desarrollo de tumores intestinales, contribuye a la aparición de complicaciones asociadas al CCR, como son debilitamiento general y anemia. En el presente estudio se constató el sangrado intestinal mediante la técnica de detección de sangre oculta por el método del guayaco, tal y como se describe en el punto 3.4 de material y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.

Como era esperable, todas las muestras analizadas procedentes del grupo cepa salvaje (C1) mostraron ausencia de sangre oculta en heces, tanto en la primera como en la novena semana. Por su parte, en todos los grupos de animales  $APC^{Min/+}$  se detectó sangre oculta en heces en ambas fechas, aumentando el sangrado intestinal en la novena semana. No obstante, la intensidad del sangrado intestinal no fue homogénea en todos los grupos de animales  $APC^{Min/+}$ . Así, los grupos alimentados con dietas suplementadas presentaron menor número de muestras con sangre oculta en heces y menor intensidad de sangrado intestinal.

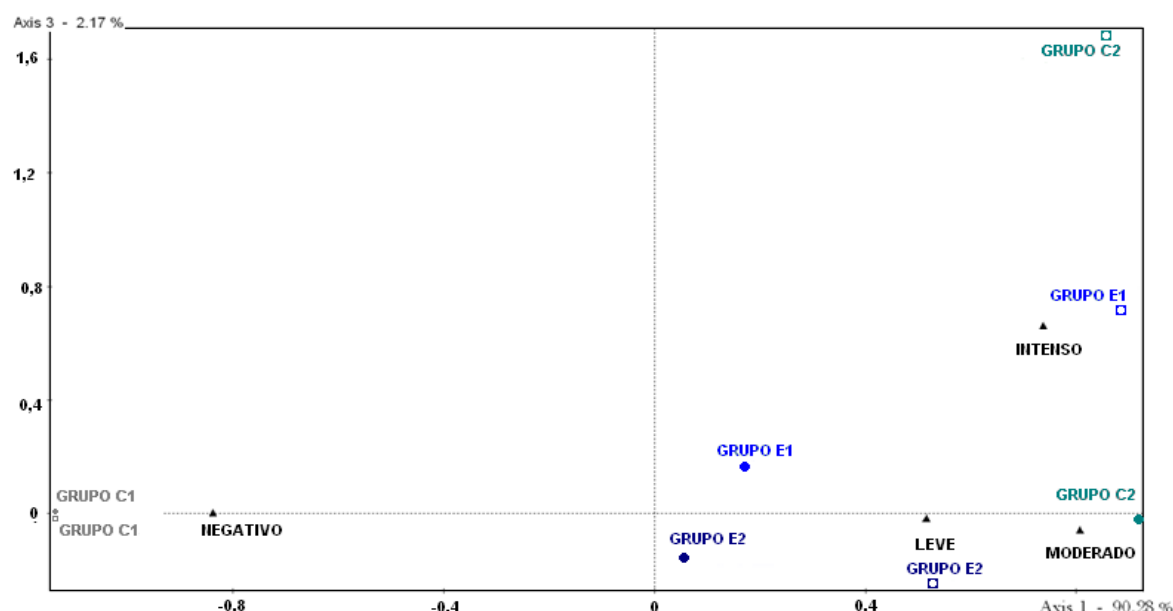
**Tabla 4.3.** Frecuencias obtenidas en el test de detección de sangre oculta en heces procedentes de los cuatro grupos experimentales (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los datos se refieren a 6 muestras independientes analizadas por triplicado. Los resultados se expresan como (-) negativo, (+) sangrado leve, (++) sangrado moderado, (+++) sangrado intenso.

| Grupo | Semana 1ª |   |    |     | Grupo | Semana 9ª |   |    |     |
|-------|-----------|---|----|-----|-------|-----------|---|----|-----|
|       | -         | + | ++ | +++ |       | -         | + | ++ | +++ |
| C1    | 18        | 0 | 0  | 0   | C1    | 18        | 0 | 0  | 0   |
| C2    | 0         | 8 | 9  | 1   | C2    | 1         | 4 | 7  | 6   |
| E1    | 6         | 8 | 3  | 1   | E1    | 0         | 9 | 6  | 3   |
| E2    | 7         | 8 | 3  | 0   | E2    | 3         | 9 | 6  | 0   |

En la Figura 4.8 se representa el resultado del análisis de correspondencia para el análisis de sangre oculta en heces. El grupo cepa salvaje (C1) se relaciona en ambas fechas con ausencia de sangre oculta en heces. El análisis de los resultados obtenidos en los animales  $APC^{Min/+}$  indica que en la primera semana, el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta control (C2) se relacionó con un sangrado intestinal moderado, mientras que las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) presentaron menor intensidad de sangrado, relacionándose con ausencia de sangre oculta en heces y sangrado leve.

Los ratones  $APC^{Min/+}$  mostraron un incremento en el sangrado intestinal en la novena semana respecto de los niveles detectados en la primera semana para cada uno de los grupos experimentales. En esta fecha, el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control (C2) se relacionó con un sangrado intestinal intenso. El grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (E1) se relacionó con un sangrado intestinal moderado-intenso. Finalmente, el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2) se relacionó con una intensidad de sangrado leve-moderado.

Los resultados que se obtuvieron ponen de manifiesto que el sangrado intestinal de los animales  $APC^{Min/+}$  aumenta conforme progresa la enfermedad. Además, las dietas suplementadas mostraron un efecto favorable, ya que se redujo la intensidad del sangrado intestinal, especialmente en el caso de la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2).



**Figura 4.8.** Análisis de correspondencia para los resultados de detección de sangre oculta en heces correspondiente a los cuatro grupos experimentales (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Datos de las semanas primera (●) y novena (■). La intensidad de sangrado se expresa como: ausencia, leve, moderada e intensa.

## 4.2. CAMBIOS METABÓLICOS

Asociado al desarrollo de algunos tipos de cáncer se aprecian alteraciones del metabolismo energético. En este sentido, se ha descrito que las células tumorales presentan una mayor glucólisis que las células no tumorales. La mayor demanda de glucosa por parte de estas células podría alterar el metabolismo de los animales <sup>150</sup>, incrementando también la utilización de carbohidratos como fuente de energía <sup>151</sup>. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se estudió la posible existencia de alteraciones en el metabolismo energético de los animales APC<sup>Min/+</sup> respecto de la cepa salvaje, así como el posible efecto de las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o en combinación con quercetina en el metabolismo energético de los ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup>. El estudio tanto del cociente respiratorio como del gasto energético se realizó mediante calorimetría indirecta.

Asimismo, la absorción intestinal de glúcidos y aminoácidos también podría verse afectada como consecuencia del desarrollo del cáncer colorrectal, con el fin de hacer frente a una mayor demanda de nutrientes por parte de las células tumorales, así como al desarrollo de inflamación intestinal. Por ello se estudió la actividad de enzimas disacaridasas y peptidasas en muestras de vesículas de borde en cepillo obtenidas a partir de yeyuno, así como la expresión del transportador de glucosa SGLT-1 y el transportador de péptidos PEPT-1.

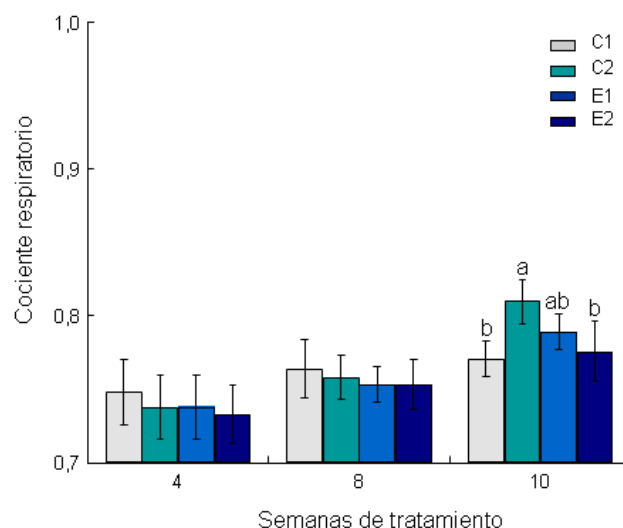
### 4.2.1. Cambios en el metabolismo energético

El metabolismo energético de los animales se estimó mediante calorimetría indirecta, siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado 3.5 de material y métodos.

#### 4.2.1.1. Cociente respiratorio

En condiciones normales el cociente respiratorio (CR) toma valores comprendidos entre 0,7 y 1. Este parámetro aporta información sobre el tipo de nutriente utilizado por el organismo como sustrato energético. Así, valores de CR próximos a la unidad indican que la fuente principal de energía son los carbohidratos, mientras que valores del cociente en torno a 0,7 indican un consumo preponderante de los lípidos. Valores intermedios se deben al consumo de varios nutrientes de forma simultánea o al consumo mayoritario de aminoácidos (0,8).

Los datos obtenidos en este estudio indican que el CR de los ratones tiende a aumentar con la edad de los mismos. Tras los análisis de los valores del CR en la 4ª y 8ª semanas no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Es en la 10ª semana de tratamiento cuando se detectó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del CR en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) respecto del grupo cepa salvaje alimentado con la dieta control (C1) y el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2). En virtud de los datos obtenidos se constata que los grupos alimentados con dietas suplementadas mantienen valores de CR similares al grupo cepa salvaje (C1), especialmente el grupo alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2). (Figura 4.9)

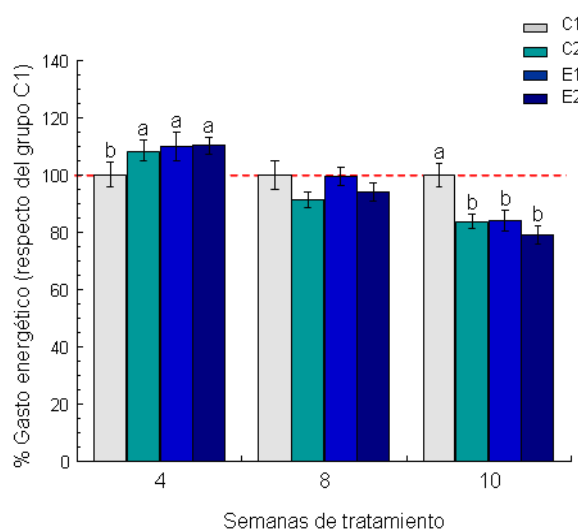


**Figura 4.9.** Resultados del cociente respiratorio de los cuatro grupos experimentales del estudio. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan como *media*  $\pm$  *desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.1.2. Gasto energético diario

El gasto energético de los ratones  $APC^{Min/+}$  (C2, E1 y E2) se relativizó tomando como referencia el grupo cepa salvaje (C1). En las diferentes mediciones del gasto energético se apreció la existencia de una evolución en el mismo en los animales  $APC^{Min/+}$  a lo largo del período experimental. Así, en la cuarta semana del período experimental, se observó que el gasto energético de los animales  $APC^{Min/+}$  fue significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) que el del grupo cepa salvaje (C1). A partir de este momento el gasto energético de los grupos  $APC^{Min/+}$  se redujo paulatinamente. No se observaron diferencias significativas en la 8ª semana del período experimental.

Finalmente, en la 10ª semana del período experimental, se observó que el gasto energético de los animales  $APC^{Min/+}$  (C2, E1 y E2) se redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en comparación con el grupo cepa salvaje. Las dietas suplementadas no modificaron el gasto energético de los animales  $APC^{Min/+}$ . (Figura 4.10)



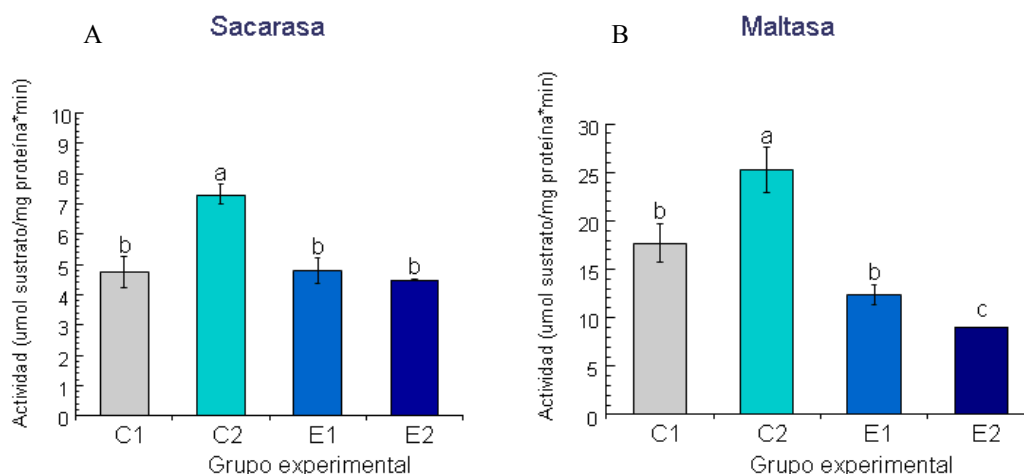
**Figura 4.10.** Resultados del gasto energético de los cuatro grupos experimentales del estudio. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan relativizados al valor del grupo C1, como *media*  $\pm$  *desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.2.2. Cambios de la actividad enzimática en yeyuno

En este apartado se recogen los resultados obtenidos en el análisis de actividad enzimática realizado tal y como se detalla en los apartados 3.6.3 y 3.6.4 de material y métodos a partir de muestras de vesículas de borde en cepillo.

#### 4.2.2.1. La actividad de las disacaridasas

Tomando como referencia el grupo cepa salvaje (C1), la actividad de las enzimas sacarasa y maltasa se incrementó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en los animales  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control (C2). Sin embargo, los grupos  $APC^{Min/+}$  alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1, E2) presentaron niveles de actividad sacarasa similares al grupo cepa salvaje (C1), siendo su actividad significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menor a la del grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta control (C2) (Figura 4.11a). La actividad maltasa en el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (E1) fue similar al grupo cepa salvaje (C1), reduciéndose significativamente ( $P \leq 0,05$ ) respecto del grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta control. El grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2) presentó una reducción significativa de la actividad maltasa en comparación con el resto de grupos (Figura 4.11b).

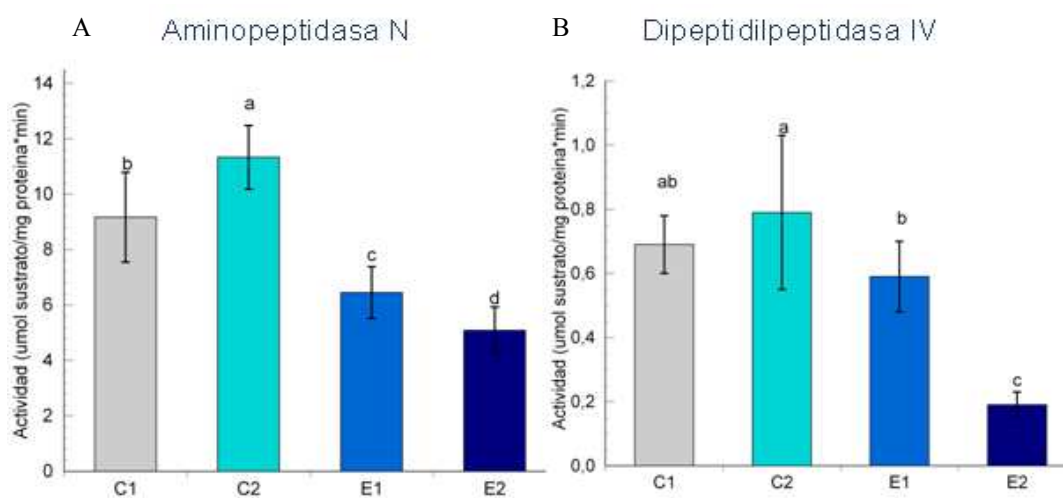


**Figura 4.11.** Resultados de la actividad enzimática específica de las enzimas sacarasa y maltasa. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan relativizados al valor del grupo C1, como *media*  $\pm$  *desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. La actividad de las peptidasas

La actividad de la enzimas aminopeptidasa N se incrementó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) por comparación con el grupo cepa salvaje (C1). Las dietas suplementadas redujeron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) la actividad de la enzima aminopeptidasa N, siendo mayor la reducción en el grupo alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2). Se detectaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre todos los grupos experimentales (Figura 4.12a).

En el caso de la actividad de la enzima dipeptidilpeptidasa IV se apreció un ligero incremento en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2), respecto del grupo cepa salvaje (C1), aunque dicho aumento no fue significativo. En el grupo de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (E1) la actividad de la enzima dipeptidilpeptidasa IV se redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) pero no con respecto del grupo cepa salvaje (C1) ( $P \leq 0,05$ ). La actividad dipeptidilpeptidasa IV presento un fuerte descenso de la actividad en el grupo de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (E2), observándose diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto del resto de grupos (Figura 4.12b).

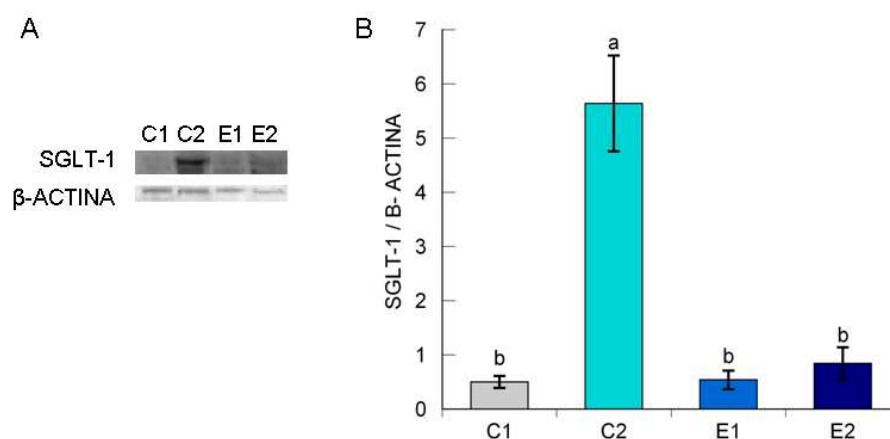


**Figura 4.12.** Resultados de la actividad enzimática específica de aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan relativizados al valor del grupo C1, como *media ± desviación estándar*. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.2.3. Expresión de transportadores de membrana en yeyuno

El estudio de expresión de los transportadores de membrana SGLT-1 y PEPT-1 se realizó en muestras de vesículas de borde en cepillo obtenidas a partir de mucosa de yeyuno mediante la técnica Western blot, siguiendo el procedimiento expuesto en el apartado 3.6.5 de material y métodos. Los resultados se muestran como expresión relativa de SGLT-1 y PEPT-1 relativizadas respecto de la expresión de la proteína constitutiva  $\beta$ -actina, utilizada como control.

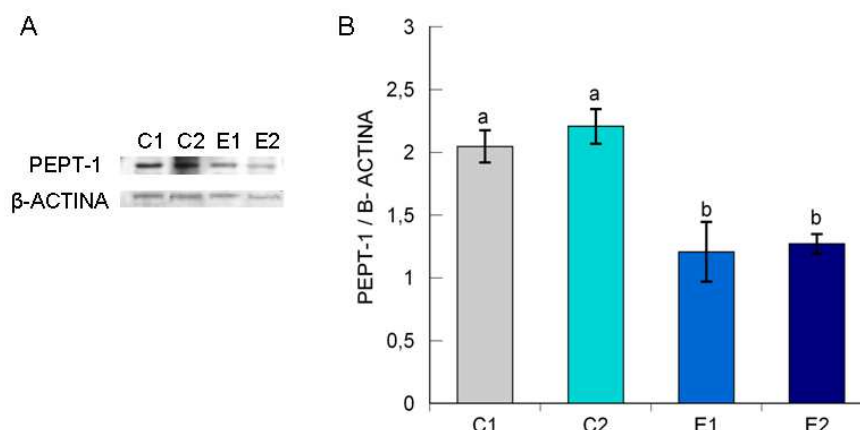
La expresión del transportador de glucosa SGLT-1 se incrementó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) respecto del grupo cepa salvaje (C1). Por su parte, las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) redujeron significativamente los niveles de expresión del transportador SGLT-1 respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2), alcanzando niveles similares al grupo cepa salvaje (C1) (Figura 4.13).



**Figura 4.13.** A: Imagen representativa del análisis Western blot realizado. B: Gráfico del nivel de SGLT-1 respecto del grupo C1. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan relativizados al valor del grupo C1, como *media  $\pm$  error estándar de la media* de tres muestras independientes de cada grupo. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

Las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) redujeron significativamente la expresión del transportador de péptidos PEPT-1 por comparación con los grupos alimentados con la dieta control (C1 y C2) (Figura 4.14)





**Figura 4.14.** A: Imagen representativa del análisis por Western blot. B: Gráfico del nivel de PEPT-1 respecto del grupo C1. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Los resultados se expresan relativizados al valor del grupo C1, como *media ± error estándar de la media* de tres muestras independientes de cada grupo. Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3. EFECTOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

La vía de señalización WNT desempeña un papel importante en los procesos de proliferación y diferenciación celular y por tanto en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio del colon. Asimismo, la desregulación de dicha vía es una de las principales causas de desarrollo de cáncer colorrectal. Los ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup> son homocigóticos para una mutación sinsentido en el gen *Apc*, la cual provoca la desregulación de la vía de señalización WNT, que da lugar a la formación de tumores intestinales de forma espontánea<sup>152</sup>.

#### 4.3.1. Efectos sobre la expresión de genes de la vía de señalización WNT

Dada la importancia del gen *Apc* en la regulación de la vía de señalización WNT se llevó a cabo un análisis de la expresión de 84 genes implicados en esta vía de señalización mediante PCR cuantitativa a tiempo real, tal y como se detalla en el apartado 3.7.1 de material y métodos. Este estudio permitió conocer el efecto de la mutación APC<sup>Min/+</sup> y de las dietas suplementadas en estudio sobre los niveles de expresión de genes relacionados con la vía de señalización WNT. Hay que anticipar que en el tejido analizado, 17 de los genes estudiados mostraron niveles de expresión muy bajos o inexistentes, por lo que estos genes no se tuvieron en cuenta en el posterior análisis de los resultados. Los genes que presentaron bajos niveles de expresión son *Dkk1*, *Fgf4*, *Fshb*, *Pitx2*, *Sox17*, *T*, *Wnt1*, *Wnt10a*, *Wnt16*, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt8a*, *Wnt8b* y *Wnt9a*.

En comparación con el grupo cepa salvaje (C1), se observó una reducción significativa ( $P \leq 0,05$ ) en los niveles de expresión de 32 de los genes analizados en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control (C2) (Tabla 4.4). Estos genes fueron *Apc*, *Bcl9*, *Csnk1d*, *Csnk2a1*, *Ctbp2*, *Ctnnb1*, *Daam1*, *Dixdc1*, *Dvl2*, *Fbxw11*, *Fbxw2*, *Fbxw4*, *Fosl1*, *Frat1*, *Fzd2*, *Fzd3*, *Fzd6*, *Kremen1*, *Lef1*, *Lrp5*, *Lrp6*, *Nkd1*, *Ppp2ca*, *Pygo1*, *Sfrp2*, *Tle2*, *Wisp1*, *Wnt11*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt5b* y *Wnt6* (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Niveles de expresión relativa de genes de la vía WNT en el grupo C2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control) respecto del grupo C1 (cepa salvaje), expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Se muestran en rojo los genes en los que se observan diferencias significativas entre ambos grupos ( $P \leq 0,05$ ).

| GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            | GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            |
|-----------------|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| <i>Aes</i>      | 0,968                 | 0,887        | <i>Fzd8</i>     | 0,387                 | 0,170        |
| <i>Apc</i>      | <b>0,493</b>          | <b>0,033</b> | <i>Gsk3b</i>    | 0,544                 | 0,140        |
| <i>Axin1</i>    | 0,735                 | 0,137        | <i>Jun</i>      | 0,746                 | 0,108        |
| <i>Bcl9</i>     | <b>0,547</b>          | <b>0,022</b> | <i>Kremen1</i>  | <b>0,615</b>          | <b>0,019</b> |
| <i>Btrc</i>     | 1,045                 | 0,835        | <i>Lef1</i>     | <b>0,161</b>          | <b>0,019</b> |
| <i>Ccnd1</i>    | 0,786                 | 0,350        | <i>Lrp5</i>     | <b>0,435</b>          | <b>0,034</b> |
| <i>Ccnd2</i>    | 0,945                 | 0,876        | <i>Lrp6</i>     | <b>0,616</b>          | <b>0,002</b> |
| <i>Ccnd3</i>    | 0,594                 | 0,132        | <i>Myc</i>      | 1,153                 | 0,742        |
| <i>Csnk1a1</i>  | 0,886                 | 0,462        | <i>Nkd1</i>     | <b>0,181</b>          | <b>0,000</b> |
| <i>Csnk1d</i>   | <b>0,381</b>          | <b>0,026</b> | <i>Nlk</i>      | 1,010                 | 0,948        |
| <i>Csnk2a1</i>  | <b>0,401</b>          | <b>0,011</b> | <i>Porcn</i>    | 0,406                 | 0,113        |
| <i>Ctbp1</i>    | 0,776                 | 0,188        | <i>Ppp2ca</i>   | <b>0,524</b>          | <b>0,012</b> |
| <i>Ctbp2</i>    | <b>0,601</b>          | <b>0,042</b> | <i>Ppp2r1a</i>  | 0,644                 | 0,090        |
| <i>Ctnnb1</i>   | <b>0,623</b>          | <b>0,016</b> | <i>Ppp2r5d</i>  | 0,800                 | 0,534        |
| <i>Ctnnbip1</i> | 0,959                 | 0,840        | <i>Pygo1</i>    | <b>0,405</b>          | <b>0,040</b> |
| <i>Daam1</i>    | <b>0,223</b>          | <b>0,002</b> | <i>Rhou</i>     | 1,358                 | 0,276        |
| <i>Dixdc1</i>   | <b>0,241</b>          | <b>0,007</b> | <i>Senp2</i>    | 0,497                 | 0,273        |
| <i>Dvl1</i>     | 0,789                 | 0,506        | <i>Sfrp1</i>    | 0,820                 | 0,568        |
| <i>Dvl2</i>     | <b>0,315</b>          | <b>0,023</b> | <i>Sfrp2</i>    | <b>0,138</b>          | <b>0,016</b> |
| <i>Ep300</i>    | 1,234                 | 0,550        | <i>Sfrp4</i>    | 0,632                 | 0,453        |
| <i>Fbxw11</i>   | <b>0,633</b>          | <b>0,030</b> | <i>Slc9a3r1</i> | 0,950                 | 0,875        |
| <i>Fbxw2</i>    | <b>0,467</b>          | <b>0,024</b> | <i>Tcf3</i>     | 1,078                 | 0,905        |
| <i>Fbxw4</i>    | <b>0,314</b>          | <b>0,000</b> | <i>Tcf7</i>     | 0,834                 | 0,379        |
| <i>Fosl1</i>    | <b>0,286</b>          | <b>0,017</b> | <i>Tle1</i>     | 0,627                 | 0,176        |
| <i>Foxn1</i>    | 0,494                 | 0,237        | <i>Tle2</i>     | <b>0,208</b>          | <b>0,029</b> |
| <i>Frat1</i>    | <b>0,418</b>          | <b>0,030</b> | <i>Wif1</i>     | 0,907                 | 0,899        |
| <i>Frzb</i>     | 0,496                 | 0,090        | <i>Wisp1</i>    | <b>0,249</b>          | <b>0,018</b> |
| <i>Fzd1</i>     | 1,118                 | 0,768        | <i>Wnt11</i>    | <b>0,125</b>          | <b>0,000</b> |
| <i>Fzd2</i>     | <b>0,246</b>          | <b>0,002</b> | <i>Wnt2b</i>    | 0,369                 | 0,069        |
| <i>Fzd3</i>     | <b>0,262</b>          | <b>0,017</b> | <i>Wnt4</i>     | <b>0,146</b>          | <b>0,055</b> |
| <i>Fzd4</i>     | 0,856                 | 0,564        | <i>Wnt5a</i>    | <b>0,349</b>          | <b>0,050</b> |
| <i>Fzd5</i>     | 0,502                 | 0,109        | <i>Wnt5b</i>    | <b>0,211</b>          | <b>0,002</b> |
| <i>Fzd6</i>     | <b>0,395</b>          | <b>0,017</b> | <i>Wnt6</i>     | <b>0,494</b>          | <b>0,049</b> |
| <i>Fzd7</i>     | 0,865                 | 0,772        |                 |                       |              |

En el grupo E1 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*), se observó una reducción significativa ( $P \leq 0,05$ ) en los niveles de expresión relativa de 16 de los genes en estudio: *Csnk2a1*, *Ctnnb1*, *Dixdc1*, *Dvl2*, *Fbxw11*, *Fbxw4*, *Frat1*, *Fzd2*, *Fzd3*, *Fzd6*, *Kremen1*, *Lrp6*, *Nkd1*, *Wnt11*, *Wnt5b* y *Wnt6*, así como incremento del nivel de expresión del gen *Jun* respecto del grupo cepa salvaje (C1) (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Niveles de expresión relativa de genes de la vía WNT en el grupo E1 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*) respecto del grupo C1 (cepa salvaje), expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Se muestran en rojo los genes en los que se observan diferencias significativas respecto del grupo C1 ( $P \leq 0,05$ ).

| GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            | GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            |
|-----------------|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| <i>Aes</i>      | 0,794                 | 0,242        | <i>Fzd8</i>     | 0,266                 | 0,078        |
| <i>Apc</i>      | 0,650                 | 0,159        | <i>Gsk3b</i>    | 0,436                 | 0,087        |
| <i>Axin1</i>    | 0,946                 | 0,828        | <i>Jun</i>      | <b>1,491</b>          | <b>0,020</b> |
| <i>Bcl9</i>     | 0,839                 | 0,332        | <i>Kremen1</i>  | <b>0,659</b>          | <b>0,050</b> |
| <i>Btrc</i>     | 0,536                 | 0,071        | <i>Lef1</i>     | 0,347                 | 0,079        |
| <i>Ccnd1</i>    | 0,924                 | 0,726        | <i>Lrp5</i>     | 0,480                 | 0,104        |
| <i>Ccnd2</i>    | 1,312                 | 0,353        | <i>Lrp6</i>     | <b>0,532</b>          | <b>0,013</b> |
| <i>Ccnd3</i>    | 0,818                 | 0,446        | <i>Myc</i>      | 0,873                 | 0,787        |
| <i>Csnk1a1</i>  | 0,809                 | 0,396        | <i>Nkd1</i>     | <b>0,289</b>          | <b>0,049</b> |
| <i>Csnk1d</i>   | 0,611                 | 0,177        | <i>Nlk</i>      | 1,494                 | 0,178        |
| <i>Csnk2a1</i>  | <b>0,506</b>          | <b>0,044</b> | <i>Porcn</i>    | 0,339                 | 0,054        |
| <i>Ctbp1</i>    | 1,384                 | 0,432        | <i>Ppp2ca</i>   | 0,696                 | 0,238        |
| <i>Ctbp2</i>    | 1,096                 | 0,744        | <i>Ppp2r1a</i>  | 0,669                 | 0,111        |
| <i>Ctnnb1</i>   | <b>0,772</b>          | <b>0,047</b> | <i>Ppp2r5d</i>  | 0,808                 | 0,585        |
| <i>Ctnnbip1</i> | 0,838                 | 0,508        | <i>Pygo1</i>    | 0,669                 | 0,486        |
| <i>Daam1</i>    | 0,516                 | 0,217        | <i>Rhou</i>     | 0,853                 | 0,773        |
| <i>Dixdc1</i>   | <b>0,299</b>          | <b>0,013</b> | <i>Senp2</i>    | 0,516                 | 0,186        |
| <i>Dvl1</i>     | 0,531                 | 0,072        | <i>Sfrp1</i>    | 0,613                 | 0,233        |
| <i>Dvl2</i>     | <b>0,374</b>          | <b>0,037</b> | <i>Sfrp2</i>    | 0,699                 | 0,633        |
| <i>Ep300</i>    | 1,104                 | 0,779        | <i>Sfrp4</i>    | 0,680                 | 0,386        |
| <i>Fbxw11</i>   | <b>0,615</b>          | <b>0,011</b> | <i>Slc9a3r1</i> | 0,889                 | 0,765        |
| <i>Fbxw2</i>    | 0,542                 | 0,115        | <i>Tcf3</i>     | 1,519                 | 0,417        |
| <i>Fbxw4</i>    | <b>0,543</b>          | <b>0,021</b> | <i>Tcf7</i>     | 1,019                 | 0,966        |
| <i>Fosl1</i>    | 0,475                 | 0,151        | <i>Tle1</i>     | 0,672                 | 0,339        |
| <i>Foxn1</i>    | 0,639                 | 0,356        | <i>Tle2</i>     | 0,424                 | 0,174        |
| <i>Frat1</i>    | <b>0,130</b>          | <b>0,001</b> | <i>Wif1</i>     | 0,821                 | 0,728        |
| <i>Frzb</i>     | 0,764                 | 0,482        | <i>Wisp1</i>    | 0,677                 | 0,486        |
| <i>Fzd1</i>     | 1,201                 | 0,586        | <i>Wnt11</i>    | <b>0,242</b>          | <b>0,029</b> |
| <i>Fzd2</i>     | <b>0,349</b>          | <b>0,009</b> | <i>Wnt2b</i>    | 0,451                 | 0,178        |
| <i>Fzd3</i>     | <b>0,170</b>          | <b>0,008</b> | <i>Wnt4</i>     | 0,730                 | 0,770        |
| <i>Fzd4</i>     | 1,064                 | 0,876        | <i>Wnt5a</i>    | 0,503                 | 0,156        |
| <i>Fzd5</i>     | 0,523                 | 0,141        | <i>Wnt5b</i>    | <b>0,302</b>          | <b>0,011</b> |
| <i>Fzd6</i>     | <b>0,259</b>          | <b>0,012</b> | <i>Wnt6</i>     | <b>0,468</b>          | <b>0,050</b> |
| <i>Fzd7</i>     | 0,706                 | 0,532        |                 |                       |              |

El análisis de los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la vía WNT en el grupo E2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina) mostró una reducción significativa ( $P \leq 0,05$ ) de los niveles de expresión respecto del grupo cepa salvaje en tan solo 8 genes. Estos genes fueron: *Dixdc1*, *Frat1*, *Fzd3*, *Kremen1*, *Lrp5*, *Lrp6*, *Wisp1* y *Wnt11*. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Niveles de expresión relativa de genes de la vía WNT en el grupo E2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina respecto del grupo C1 (cepa salvaje), expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Se muestran en rojo los genes en los que se observan diferencias significativas respecto del grupo C1 ( $P \leq 0,05$ ).

| GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            | GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            |
|-----------------|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| <i>Aes</i>      | 1,365                 | 0,334        | <i>Fzd8</i>     | 0,543                 | 0,373        |
| <i>Apc</i>      | 0,696                 | 0,433        | <i>Gsk3b</i>    | 0,559                 | 0,319        |
| <i>Axin1</i>    | 0,680                 | 0,272        | <i>Jun</i>      | 1,092                 | 0,671        |
| <i>Bcl9</i>     | 0,755                 | 0,323        | <i>Kremen1</i>  | <b>0,483</b>          | <b>0,018</b> |
| <i>Btrc</i>     | 0,543                 | 0,167        | <i>Lef1</i>     | 0,215                 | 0,151        |
| <i>Ccnd1</i>    | 0,779                 | 0,446        | <i>Lrp5</i>     | <b>0,415</b>          | <b>0,036</b> |
| <i>Ccnd2</i>    | 0,957                 | 0,895        | <i>Lrp6</i>     | <b>0,579</b>          | <b>0,001</b> |
| <i>Ccnd3</i>    | 0,915                 | 0,787        | <i>Myc</i>      | 1,120                 | 0,833        |
| <i>Csnk1a1</i>  | 1,039                 | 0,865        | <i>Nkd1</i>     | 0,524                 | 0,167        |
| <i>Csnk1d</i>   | 0,829                 | 0,724        | <i>Nlk</i>      | 1,334                 | 0,091        |
| <i>Csnk2a1</i>  | 0,657                 | 0,360        | <i>Porcn</i>    | 0,481                 | 0,167        |
| <i>Ctbp1</i>    | 1,288                 | 0,446        | <i>Ppp2ca</i>   | 1,254                 | 0,317        |
| <i>Ctbp2</i>    | 0,905                 | 0,716        | <i>Ppp2r1a</i>  | 0,873                 | 0,654        |
| <i>Ctnnb1</i>   | 0,935                 | 0,742        | <i>Ppp2r5d</i>  | 0,797                 | 0,540        |
| <i>Ctnnbip1</i> | 0,859                 | 0,505        | <i>Pygo1</i>    | 0,607                 | 0,441        |
| <i>Daam1</i>    | 0,618                 | 0,425        | <i>Rhou</i>     | 0,979                 | 0,909        |
| <i>Dixdc1</i>   | <b>0,369</b>          | <b>0,040</b> | <i>Senp2</i>    | 0,572                 | 0,301        |
| <i>Dvl1</i>     | 0,592                 | 0,313        | <i>Sfrp1</i>    | 0,751                 | 0,371        |
| <i>Dvl2</i>     | 0,620                 | 0,370        | <i>Sfrp2</i>    | 0,465                 | 0,349        |
| <i>Ep300</i>    | 1,153                 | 0,751        | <i>Sfrp4</i>    | 0,842                 | 0,719        |
| <i>Fbxw11</i>   | 0,883                 | 0,625        | <i>Slc9a3r1</i> | 0,889                 | 0,670        |
| <i>Fbxw2</i>    | 0,540                 | 0,165        | <i>Tcf3</i>     | 1,486                 | 0,506        |
| <i>Fbxw4</i>    | 0,714                 | 0,383        | <i>Tcf7</i>     | 0,717                 | 0,326        |
| <i>Fosl1</i>    | 0,374                 | 0,058        | <i>Tle1</i>     | 0,545                 | 0,141        |
| <i>Foxn1</i>    | 0,334                 | 0,168        | <i>Tle2</i>     | 1,000                 | 1,000        |
| <i>Frat1</i>    | <b>0,330</b>          | <b>0,010</b> | <i>Wif1</i>     | 1,196                 | 0,829        |
| <i>Frzb</i>     | 0,904                 | 0,842        | <i>Wisp1</i>    | <b>0,283</b>          | <b>0,098</b> |
| <i>Fzd1</i>     | 1,311                 | 0,480        | <i>Wnt11</i>    | <b>0,268</b>          | <b>0,080</b> |
| <i>Fzd2</i>     | 0,822                 | 0,655        | <i>Wnt2b</i>    | 0,517                 | 0,201        |
| <i>Fzd3</i>     | <b>0,270</b>          | <b>0,033</b> | <i>Wnt4</i>     | 0,737                 | 0,801        |
| <i>Fzd4</i>     | 0,798                 | 0,370        | <i>Wnt5a</i>    | 0,355                 | 0,133        |
| <i>Fzd5</i>     | 0,481                 | 0,179        | <i>Wnt5b</i>    | 0,477                 | 0,139        |
| <i>Fzd6</i>     | 0,579                 | 0,206        | <i>Wnt6</i>     | 0,675                 | 0,535        |
| <i>Fzd7</i>     | 1,041                 | 0,926        |                 |                       |              |

Los resultados obtenidos en los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dietas suplementadas se compararon también respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control, estos resultados se muestran a continuación. En la Tabla 4.7 se muestran los niveles relativos de expresión genética de la vía WNT en el grupo E1 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*) expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$  respecto del grupo C2 (APC<sup>Min/+</sup>

alimentado con dieta control). En dicha comparación se apreció una reducción significativa ( $P \leq 0,05$ ) de los niveles de expresión del gen *Frat*, así como un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) de de expresión en los genes; *Bcl9*, *Daam1*, *Fbxw4*, *Jun*, *Sfrp2* y *Wisp1*.

**Tabla 4.7.** Niveles de expresión relativa de genes de la vía WNT en el grupo E1 ( $APC^{Min/+}$  alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*) respecto del grupo C2 ( $APC^{Min/+}$  alimentados con dieta control), expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Se muestran en rojo los genes en los que se observan diferencias significativas respecto del grupo C2 ( $P \leq 0,05$ ).

| GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            | GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            |
|-----------------|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| <i>Aes</i>      | 0,820                 | 0,327        | <i>Fzd8</i>     | 0,687                 | 0,566        |
| <i>Apc</i>      | 1,319                 | 0,398        | <i>Gsk3b</i>    | 0,801                 | 0,501        |
| <i>Axin1</i>    | 1,288                 | 0,433        | <i>Jun</i>      | <b>2,000</b>          | <b>0,003</b> |
| <i>Bcl9</i>     | <b>1,533</b>          | <b>0,025</b> | <i>Kremen1</i>  | 1,071                 | 0,647        |
| <i>Btrc</i>     | 0,513                 | 0,082        | <i>Lef1</i>     | 2,153                 | 0,227        |
| <i>Ccnd1</i>    | 1,175                 | 0,407        | <i>Lrp5</i>     | 1,103                 | 0,748        |
| <i>Ccnd2</i>    | 1,388                 | 0,344        | <i>Lrp6</i>     | 0,863                 | 0,409        |
| <i>Ccnd3</i>    | 1,375                 | 0,334        | <i>Myc</i>      | 0,757                 | 0,509        |
| <i>Csnk1a1</i>  | 0,913                 | 0,715        | <i>Nkd1</i>     | 1,595                 | 0,359        |
| <i>Csnk1d</i>   | 1,606                 | 0,185        | <i>Nlk</i>      | 1,479                 | 0,237        |
| <i>Csnk2a1</i>  | 1,264                 | 0,400        | <i>Porcn</i>    | 0,835                 | 0,686        |
| <i>Ctbp1</i>    | 1,784                 | 0,135        | <i>Ppp2ca</i>   | 1,327                 | 0,419        |
| <i>Ctbp2</i>    | 1,825                 | 0,059        | <i>Ppp2r1a</i>  | 1,040                 | 0,884        |
| <i>Ctnnb1</i>   | 1,239                 | 0,208        | <i>Ppp2r5d</i>  | 1,010                 | 0,978        |
| <i>Ctnnbip1</i> | 0,874                 | 0,531        | <i>Pygol</i>    | 1,649                 | 0,222        |
| <i>Daam1</i>    | <b>2,312</b>          | <b>0,045</b> | <i>Rhou</i>     | 0,629                 | 0,434        |
| <i>Dixdc1</i>   | 1,238                 | 0,587        | <i>Senp2</i>    | 1,038                 | 0,952        |
| <i>Dvl1</i>     | 0,674                 | 0,234        | <i>Sfrp1</i>    | 0,748                 | 0,486        |
| <i>Dvl2</i>     | 1,186                 | 0,669        | <i>Sfrp2</i>    | <b>5,066</b>          | <b>0,015</b> |
| <i>Ep300</i>    | 0,894                 | 0,681        | <i>Sfrp4</i>    | 1,076                 | 0,895        |
| <i>Fbxw11</i>   | 0,972                 | 0,881        | <i>Slc9a3r1</i> | 0,935                 | 0,889        |
| <i>Fbxw2</i>    | 1,161                 | 0,540        | <i>Tcf3</i>     | 1,409                 | 0,539        |
| <i>Fbxw4</i>    | <b>1,729</b>          | <b>0,023</b> | <i>Tcf7</i>     | 1,222                 | 0,583        |
| <i>Fosl1</i>    | 1,661                 | 0,331        | <i>Tle1</i>     | 1,072                 | 0,824        |
| <i>Foxn1</i>    | 1,296                 | 0,600        | <i>Tle2</i>     | 2,036                 | 0,282        |
| <i>Frat1</i>    | <b>0,310</b>          | <b>0,018</b> | <i>Wif1</i>     | 0,904                 | 0,900        |
| <i>Frzb</i>     | 1,541                 | 0,151        | <i>Wisp1</i>    | <b>2,720</b>          | <b>0,023</b> |
| <i>Fzd1</i>     | 1,075                 | 0,877        | <i>Wnt11</i>    | 1,940                 | 0,225        |
| <i>Fzd2</i>     | 1,421                 | 0,119        | <i>Wnt2b</i>    | 1,221                 | 0,648        |
| <i>Fzd3</i>     | 0,649                 | 0,334        | <i>Wnt4</i>     | 4,994                 | 0,103        |
| <i>Fzd4</i>     | 1,244                 | 0,582        | <i>Wnt5a</i>    | 1,440                 | 0,371        |
| <i>Fzd5</i>     | 1,044                 | 0,923        | <i>Wnt5b</i>    | 1,428                 | 0,199        |
| <i>Fzd6</i>     | 0,655                 | 0,342        | <i>Wnt6</i>     | 0,947                 | 0,816        |
| <i>Fzd7</i>     | 0,815                 | 0,722        |                 |                       |              |

En la Tabla 4.8 se muestran los niveles de expresión relativa de genes de la vía WNT en el grupo E2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina) expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$  respecto del grupo C2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control). En dicho grupo, los niveles de expresión de los genes; *Daam1*, *Fbxw4*, *Fzd2*, *Nkd1*, *Ppp2ca*, *Sfrp2*, *Tle2* y *Wnt5b* se incrementaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 4.8.** Niveles de expresión relativa de genes de la vía WNT en el grupo E2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina) respecto del grupo C2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta control), expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Se muestran en rojo los genes en los que se observan diferencias significativas respecto del grupo C2. ( $P \leq 0,05$ ).

| GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            | GEN             | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | P            |
|-----------------|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| <i>Aes</i>      | 1,410                 | 0,267        | <i>Fzd8</i>     | 1,404                 | 0,598        |
| <i>Apc</i>      | 1,411                 | 0,479        | <i>Gsk3b</i>    | 1,027                 | 0,953        |
| <i>Axin1</i>    | 0,925                 | 0,847        | <i>Jun</i>      | 1,465                 | 0,095        |
| <i>Bcl9</i>     | 1,379                 | 0,250        | <i>Kremen1</i>  | 0,785                 | 0,272        |
| <i>Btrc</i>     | 0,520                 | 0,187        | <i>Lef1</i>     | 1,333                 | 0,762        |
| <i>Ccnd1</i>    | 0,991                 | 0,975        | <i>Lrp5</i>     | 0,955                 | 0,850        |
| <i>Ccnd2</i>    | 1,012                 | 0,975        | <i>Lrp6</i>     | 0,939                 | 0,571        |
| <i>Ccnd3</i>    | 1,540                 | 0,282        | <i>Myc</i>      | 0,971                 | 0,947        |
| <i>Csnk1a1</i>  | 1,173                 | 0,491        | <i>Nkd1</i>     | <b>2,894</b>          | <b>0,016</b> |
| <i>Csnk1d</i>   | 2,178                 | 0,183        | <i>Nlk</i>      | 1,321                 | 0,235        |
| <i>Csnk2a1</i>  | 1,639                 | 0,268        | <i>Porcn</i>    | 1,185                 | 0,705        |
| <i>Ctbp1</i>    | 1,660                 | 0,108        | <i>Ppp2ca</i>   | <b>2,392</b>          | <b>0,014</b> |
| <i>Ctbp2</i>    | 1,505                 | 0,172        | <i>Ppp2r1a</i>  | 1,356                 | 0,370        |
| <i>Ctnnb1</i>   | 1,500                 | 0,109        | <i>Ppp2r5d</i>  | 0,996                 | 0,991        |
| <i>Ctnnbip1</i> | 0,896                 | 0,501        | <i>Pygo1</i>    | 1,496                 | 0,400        |
| <i>Daam1</i>    | <b>2,768</b>          | <b>0,031</b> | <i>Rhou</i>     | 0,721                 | 0,283        |
| <i>Dixdc1</i>   | 1,531                 | 0,284        | <i>Senp2</i>    | 1,151                 | 0,832        |
| <i>Dvl1</i>     | 0,751                 | 0,572        | <i>Sfrp1</i>    | 0,916                 | 0,795        |
| <i>Dvl2</i>     | 1,967                 | 0,210        | <i>Sfrp2</i>    | <b>3,370</b>          | <b>0,053</b> |
| <i>Ep300</i>    | 0,934                 | 0,854        | <i>Sfrp4</i>    | 1,333                 | 0,640        |
| <i>Fbxw11</i>   | 1,394                 | 0,234        | <i>Slc9a3r1</i> | 0,936                 | 0,865        |
| <i>Fbxw2</i>    | 1,156                 | 0,624        | <i>Tcf3</i>     | 1,379                 | 0,612        |
| <i>Fbxw4</i>    | <b>2,272</b>          | <b>0,046</b> | <i>Tcf7</i>     | 0,860                 | 0,524        |
| <i>Fosl1</i>    | 1,307                 | 0,586        | <i>Tle1</i>     | 0,870                 | 0,581        |
| <i>Foxn1</i>    | 0,676                 | 0,589        | <i>Tle2</i>     | <b>4,796</b>          | <b>0,062</b> |
| <i>Frat1</i>    | 0,788                 | 0,481        | <i>Wif1</i>     | 1,318                 | 0,766        |
| <i>Frzb</i>     | 1,824                 | 0,162        | <i>Wisp1</i>    | 1,139                 | 0,781        |
| <i>Fzd1</i>     | 1,173                 | 0,749        | <i>Wnt11</i>    | 2,149                 | 0,280        |
| <i>Fzd2</i>     | <b>3,346</b>          | <b>0,012</b> | <i>Wnt2b</i>    | 1,400                 | 0,267        |
| <i>Fzd3</i>     | 1,031                 | 0,941        | <i>Wnt4</i>     | 5,042                 | 0,166        |
| <i>Fzd4</i>     | 0,932                 | 0,805        | <i>Wnt5a</i>    | 1,014                 | 0,980        |
| <i>Fzd5</i>     | 0,958                 | 0,937        | <i>Wnt5b</i>    | <b>2,257</b>          | <b>0,020</b> |
| <i>Fzd6</i>     | 1,467                 | 0,347        | <i>Wnt6</i>     | 1,366                 | 0,559        |
| <i>Fzd7</i>     | 1,203                 | 0,694        |                 |                       |              |

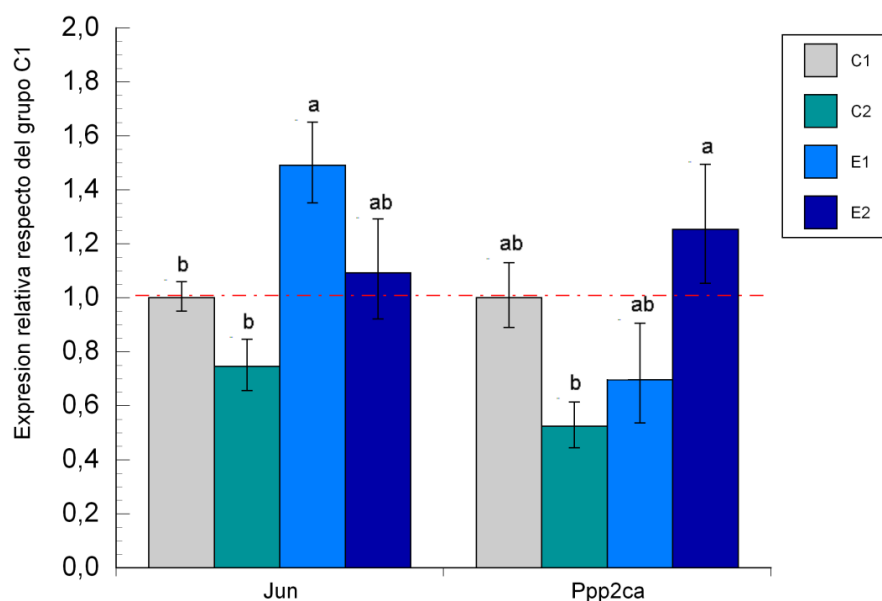
Las dietas suplementadas modificaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) los niveles de expresión de los genes *Jun*, *Ppp2ca*, *Frat1*, *Bcl9*, *Daam1*, *Fbxw4*, *Fzd2*, *Nkd1*, *Sfrp2*, *Tle2*, *Wisp1* y *Wnt5b* en comparación con el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control. A continuación se analizan con más detalle la expresión de estos genes.

La expresión del gen *Jun* se redujo en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control (C2) respecto del grupo cepa salvaje (C1), sin embargo no mostró diferencias significativas. En el grupo E1 (APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*) se observó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) en el nivel de expresión de dicho gen respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2). El grupo E2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina) recuperó el nivel de expresión normal, no presentando diferencias significativas con el resto de grupos (Figura 4.15.).

La expresión del gen *Ppp2ca* se redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) respecto del grupo cepa salvaje (C1). El grupo E1 (APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*) presentó un ligero incremento de la expresión del gen *Ppp2ca*, no observándose diferencias significativas respecto del resto de grupos. La expresión de este gen se vio incrementada significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en el grupo E2 (APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina) respecto del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control (C2) (Figura 4.15.).

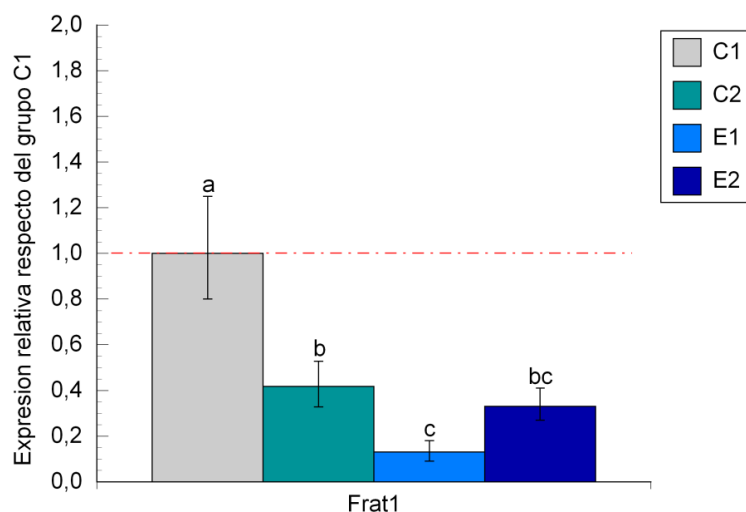
La expresión del gen *Frat1* se redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en todos los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> respecto del grupo cepa salvaje (C1). La reducción fue significativamente mayor en los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina (E1 y E2) (Figura 4.16).



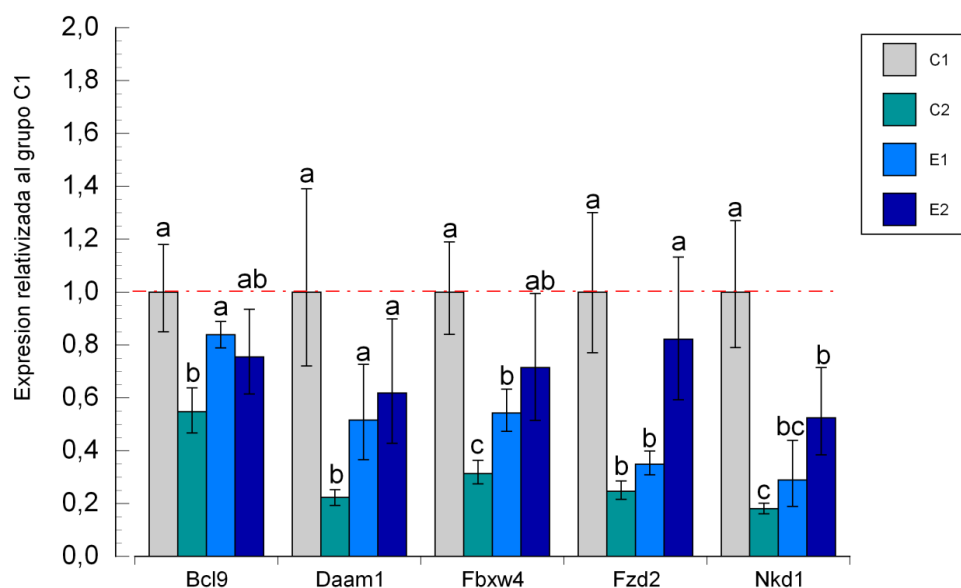


**Figura 4.15.** Niveles de expresión de los genes *Jun* y *Ppp2ca* expresados como  $2^{\Delta\Delta C_t}$ , relativizados al grupo C1. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

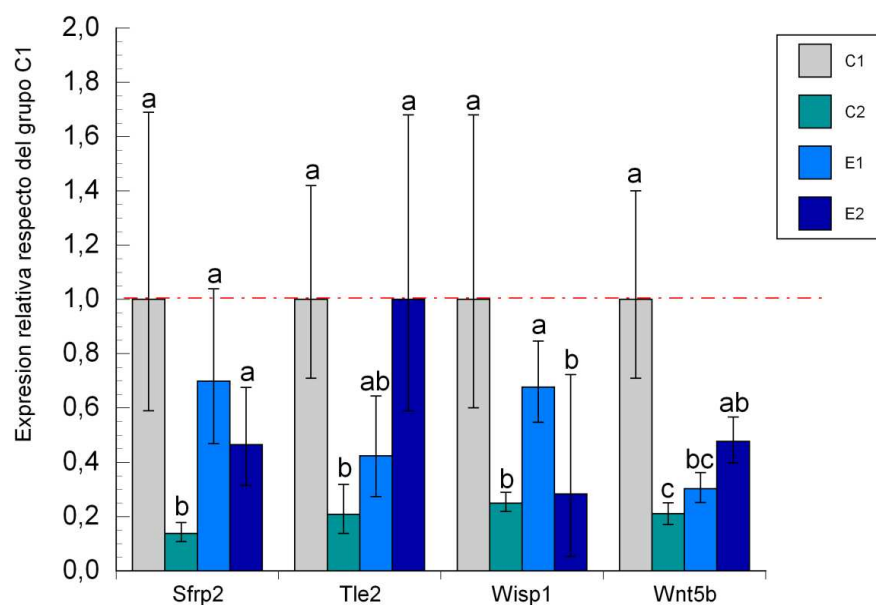
Además de los genes expuestos anteriormente, el grupo E1 ( $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*) incrementó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) los niveles de expresión de los genes *Bcl9*, *Wisp1*, *Daam1*, *Fbxw4* y *Sfrp2*, en comparación con el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control (C2). Los niveles de expresión de estos genes en el grupo E1 se recuperaron hasta niveles similares al grupo cepa salvaje (C1). Por su parte, el grupo E2 ( $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina) incrementó significativamente los niveles de expresión de los genes *Fzd2*, *Nkd1*, *Ppp2ca*, *Wnt5b*, *Daam1*, *Fbxw4* y *Sfrp2*, en comparación con el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control (C2). Los niveles de expresión de estos genes en el grupo E2 se recuperaron hasta niveles similares al grupo cepa salvaje (C1). El nivel de expresión de los genes *Daam1*, *Fbxw4* y *Sfrp2* se incrementaron significativamente con ambas dietas suplementadas respecto del grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control. Estos resultados se muestran en las Figuras 4.17 y 4.18.



**Figura 4.16.** Niveles de expresión del gen *Frat* expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , relativizados al grupo C1. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

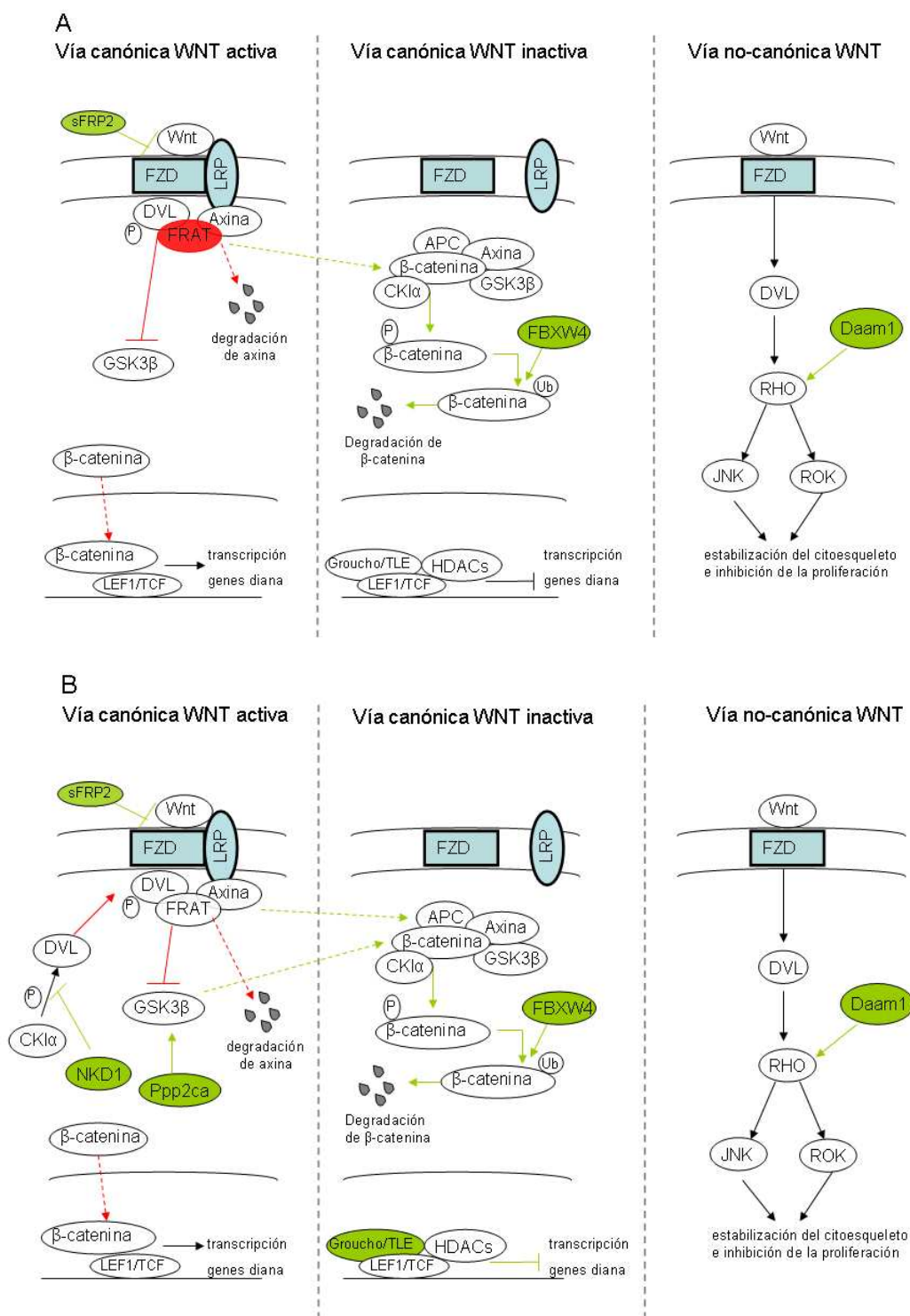


**Figura 4.17.** Niveles de expresión relativa de genes expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , relativizados al grupo C1. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con *Bf*, *Lg* y quercetina). Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 4.18.** Niveles de expresión relativa de genes expresados como  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , relativizados al grupo C1. (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control; E1: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2: APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

En la Figura 4.19 se muestra el efecto de las dietas suplementadas en ratones APC<sup>Min/+</sup> sobre la expresión de genes implicados en la vía de señalización celular WNT y su posible efecto inhibidor de la vía canónica WNT.

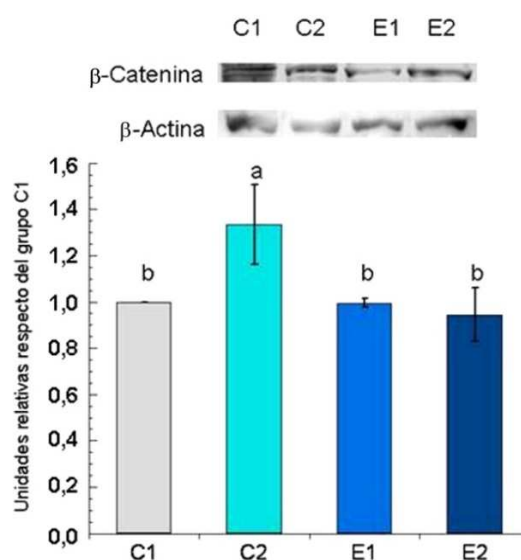


**Figura 4.19.** Efecto de la suplementación de dietas sobre la vía de señalización celular WNT. Se indican en color verde los genes cuya expresión se ve incrementada como consecuencia de la alimentación de los animales APC<sup>Min/+</sup> con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg* (A) o con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina (B), mientras que se muestran en rojo aquellos que se reducen. Las flechas verdes indican aquellas vías que se activan, mientras que las flechas rojas indican las que son inhibidas como consecuencia de las modificaciones de las modificaciones en los genes involucrados en dicha vía.

### 4.3.2. Efecto sobre la expresión de $\beta$ -catenina en colon

Se ha descrito que la pérdida de funcionalidad de la proteína APC en el modelo animal  $APC^{Min/+}$  provoca la acumulación de  $\beta$ -catenina y es la causa de la formación de pólipos intestinales. Los resultados obtenidos hasta el momento indicaron que las dietas suplementadas reducen la formación de focos de criptas aberrantes y adenomas, modificando a su vez los niveles de expresión de algunos genes implicados en la vía de señalización WNT. Con el fin de estudiar si la reducción de lesiones intestinales observada se corresponde con reducciones de la expresión de  $\beta$ -catenina en el colon, se estudió la expresión de dicha proteína mediante Western blot en lisados celulares obtenidos a partir de colon distal, siguiendo la metodología detallada en el apartado 3.7.2 de material y métodos. Los resultados se muestran como expresión relativa de  $\beta$ -catenina, relativizada respecto de la expresión de la proteína constitutiva  $\beta$ -actina, utilizada como control.

Se observó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) de la expresión relativa de  $\beta$ -catenina en colon distal en el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta control (C2) respecto del grupo cepa salvaje (C1). Los grupos  $APC^{Min/+}$  alimentados con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina, presentaron concentraciones relativas de la proteína  $\beta$ -catenina similares al grupo cepa salvaje. Ambas dietas suplementadas redujeron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) la concentración de la proteína  $\beta$ -catenina respecto del grupo  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control (C2).



**Figura 4.20.** Resultado del análisis Western blot realizado en el estudio de la  $\beta$ -catenina (imagen superior) y expresión relativa de  $\beta$ -catenina respecto del control cepa salvaje (imagen inferior). Los resultados se expresan como *media  $\pm$  error estándar de la media* de 6 animales de grupo experimental (C1: cepa salvaje alimentado con dieta control; C2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta control; E1:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf* y *Lg*; E2:  $APC^{Min/+}$  alimentado con dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina). Las medias con diferente letra presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3.3. Efectos sobre los niveles de metilación de genes

Los resultados obtenidos en los análisis de expresión de genes relacionados con la vía WNT mostraron la existencia de cambios en los niveles de expresión de estos genes como consecuencia de la alimentación con las dietas suplementadas. Estos resultados hicieron pensar que los niveles de expresión podían estar modificados como consecuencia de cambios en el estado de metilación. Por ello, se propuso analizar el estado de metilación de varios de los genes estudiados, seleccionándose para un primer análisis los genes *Apc* y *Fbxw4*. La elección del gen *Apc* se debió a que se ha descrito su silenciamiento en tumores de cáncer colorrectal por hipermetilación del promotor<sup>153</sup> y además, en el estudio de expresión genética se observó una reducción de la expresión de dicho gen en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control, mientras que los grupos alimentados con las dietas suplementadas presentaron una recuperación de los niveles de expresión de la cepa salvaje. Por tanto reunía una serie de características que hacían interesante su estudio.

En el caso del gen *Fbxw4* se selecciono este gen para su estudio por presentar una reducción significativa de la expresión en el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control (C2) respecto del grupo cepa salvaje (C1). Además, ambas dietas suplementadas incrementaron significativamente su expresión, en comparación con el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con dieta control, siendo uno de los genes en los que el efecto de las dietas fue más evidente.

Los estudios de metilación se realizaron siguiendo la metodología detallada en el apartado 3.8 de material y métodos. No se detectaron diferencias en el estado de metilación de ninguno de los genes estudiados entre los diferentes grupos experimentales. Al no encontrarse diferencias en el estado de metilación en ninguno de estos genes, que *a priori* reunían características que les hacían buenos candidatos, se abandonó esta vía de investigación.







## 5). Discusión

---



En el presente trabajo se han estudiado los posibles efectos beneficiosos de la suplementación de dietas con probióticos microencapsulados (*Bf* y *Lg*), solos o en combinación con quercetina microencapsulada frente al desarrollo del cáncer colorrectal. Para ello, se utilizaron ratones de la cepa de APC<sup>Min</sup> como modelo animal. Estos animales portan una mutación en el gen *Apc* por la que se desregula la vía de señalización WNT y desarrollan espontáneamente tumores en el tracto gastrointestinal<sup>79,152</sup>. Al igual que sucede con los humanos, el cáncer colorrectal en estos animales se asocia con otras alteraciones, como son el desarrollo de caquexia, sangrado intestinal<sup>152,154</sup> y alteraciones en diferentes órganos<sup>156</sup>.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que las microcápsulas utilizadas en el presente estudio protegen a los probióticos frente a las condiciones del tracto digestivo, incrementando su supervivencia. Esta capacidad protectora evita a su vez la metabolización o degradación de la quercetina antes de alcanzar el colon<sup>137</sup>.

## 5.1. EFECTOS DE LAS DIETAS SUPLEMENTADAS A NIVEL SISTÉMICO.

### 5.1.1. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto no sólo el menor crecimiento corporal de los ratones APC<sup>Min/+</sup>, sino también la existencia de pérdida de peso corporal en la última fase del período experimental. Tales resultados coinciden con las observaciones realizadas por otros autores en diversos modelos murinos de cáncer de colon, incluida la cepa APC<sup>Min/+</sup><sup>154,157</sup>. La administración de las dietas suplementadas con *Bf* y *Lg*, solos o con quercetina, mejoran la ganancia de peso corporal de los ratones APC<sup>Min/+</sup> durante la fase de crecimiento, haciéndola similar a la de la cepa salvaje. Además, aunque no evitan completamente la pérdida de peso corporal, las dietas suplementadas ayudan a estabilizar el peso corporal de los ratones APC<sup>Min/+</sup> en la fase final del experimento. Otros investigadores también aprecian este efecto al suplementar dietas con otros probióticos<sup>149,158</sup>, así como con diferentes polifenoles<sup>159,160</sup>. Del mismo modo, en humanos se ha observado que la suplementación de dietas con ácidos grasos omega-3, con probióticos y micronutrientes mejora el peso corporal de los pacientes oncológicos<sup>161</sup>. Los resultados indican que la suplementación de dietas con este tipo de compuestos podría tener un efecto beneficioso frente a la pérdida de peso corporal asociada al desarrollo de cáncer colorrectal.

También hay que señalar la importante pérdida de tejido adiposo observada en los ratones APC<sup>Min/+</sup>, fenómeno apreciado también por otros autores<sup>72,157,162</sup>. Ahora bien, aunque estadísticamente no es significativa, los ratones APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas presentaron una menor pérdida de tejido adiposo.

Finalmente, la reducción en la masa muscular no fue significativa estadísticamente, a diferencia de lo apreciado en otros estudios <sup>159,163</sup>, incluidos estudios en la cepa APC<sup>Min/+</sup>, en la que se han descrito pérdidas de hasta el 20% del músculo gastrocnemio <sup>72</sup>. Quizás un período experimental más prolongado se hubiese acompañado de una mayor pérdida de peso corporal y, consecuentemente de tejido muscular.

La pérdida de peso corporal, así como de tejido adiposo y muscular es un fenómeno frecuente en enfermedades neoplásicas, englobándose todos ellos dentro del síndrome denominado caquexia. El desarrollo de caquexia afecta tanto a la calidad de vida como a la supervivencia. Se considera que la inflamación, concretamente el incremento de las concentraciones de proteínas de fase aguda y de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente IL-6 y TNF- $\alpha$ , juegan un papel destacado en el desarrollo de caquexia <sup>70</sup>. Estudios previos en ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup> indican que el desarrollo de caquexia se produce como consecuencia de la formación de tumores intestinales, el incremento de IL-6 <sup>157</sup> y de la permeabilidad intestinal como consecuencia de la pérdida de integridad de la barrera intestinal. El efecto preventivo de los probióticos frente al desarrollo de caquexia podría deberse a la reducción de tumores a nivel intestinal, así como a la capacidad de estos compuestos de mejorar el efecto barrera a nivel intestinal y de reducir la inflamación intestinal mediante la reducción de expresión de citoquinas pro-inflamatorias <sup>114</sup>. En este sentido, estudios previos indican que la administración de dietas suplementadas con *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado a ratones APC<sup>Min/+</sup> muestra una reducción de la pérdida de peso corporal, que se corresponde con una reducción del número de lesiones intestinales, así como de la expresión de IL-6 <sup>149</sup>.

### 5.1.2. Efectos sobre órganos

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, al igual que otros autores, indican que los ratones APC<sup>Min/+</sup> presentan alteraciones en diferentes órganos internos <sup>148,156,163</sup>. Concretamente, en el presente trabajo se observa incremento significativo en los pesos del bazo y del hígado.

En el caso del bazo, dicho incremento puede estar asociado al desarrollo de inflamación intestinal <sup>164</sup>, al incremento de la proliferación celular como consecuencia de la desregulación de la vía WNT y al incremento de la hematopoyesis como mecanismo de compensación frente al sangrado intestinal crónico <sup>156</sup>. Nuestros resultados evidencian que la administración de dietas suplementadas con *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina, reduce parcialmente el incremento de peso del bazo en ratones APC<sup>Min/+</sup>, sin embargo, el efecto beneficioso de estas dietas es limitado, no observándose una mejoría estadísticamente significativa. Estos resultados contrastan con las observaciones realizadas por Murphy y col. <sup>101</sup> quienes refieren que la alimentación de esta misma

cepa de ratones con dieta suplementada con quercetina al 0,02%, reduce significativamente el peso del bazo.

En el presente estudio, los ratones APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta control, así como los alimentados con la dieta suplementada con *Bf* y *Lg*, presentan un incremento significativo del peso del hígado respecto de la cepa salvaje. Por su parte, la alimentación de ratones APC<sup>Min/+</sup> con la dieta suplementada con *Bf*, *Lg* y quercetina inhibe la aparición de hepatomegalia, presentando pesos similares a la cepa salvaje. Debido a que la formación de metástasis en hígado es relativamente frecuente en cáncer de colon <sup>165</sup>, se sugiere que el incremento de peso del hígado en los animales APC<sup>Min/+</sup>, puede ser que se debiera al desarrollo de metástasis o al desarrollo de hepatocarcinoma. La suplementación de la dieta únicamente con probióticos no muestra efecto frente al desarrollo de hepatomegalia, sin embargo, la suplementación de la dieta con los probióticos más quercetina la inhibe. Este hecho refuerza la hipótesis propuesta, puesto que el hígado es un órgano en el que se metaboliza y acumula quercetina <sup>166</sup> y son numerosos los estudios que evidencian el efecto antimetastático y anticarcinogénico de la quercetina <sup>167,168</sup>. Sin embargo, se necesitaran nuevos estudios que determinen si el incremento del peso de hígado es debido al desarrollo de metástasis, y si la suplementación de las dietas con probióticos más quercetina tiene efecto antimetastático.

A pesar de que otros autores refieren reducción del peso y tamaño del timo en los ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup> a partir de las 15 semanas de edad <sup>148</sup>, en el presente estudio no se ha observado la existencia de alteraciones significativas en dicho órgano, resultados que por otra parte están de acuerdo con otros autores <sup>156</sup>. En el presente estudio tampoco se ha observado que las dietas suplementadas tengan ningún efecto sobre el peso del timo.

### 5.1.3. Efectos sobre el sangrado intestinal

Los resultados del presente estudio evidenciaron que los ratones APC<sup>Min/+</sup> desarrollan sangrado intestinal desde fechas tempranas. Además, tanto la incidencia como de la intensidad del sangrado intestinal se incrementa con el envejecimiento de los animales. Otros autores también han observado este hecho con la misma cepa de ratones <sup>149</sup>, proponiéndose que el sangrado intestinal puede contribuir al incremento del tamaño del bazo <sup>156</sup>, así como al desarrollo de otras complicaciones, como por ejemplo anemia <sup>152</sup>. La suplementación de las dietas con *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina, redujo tanto la incidencia como la intensidad del sangrado intestinal en los animales APC<sup>Min/+</sup>, observándose un mayor efecto de la dieta suplementada con *Bf*, *Lg* y quercetina.

Al igual que nuestros resultados, estudios previos en la misma cepa de ratones indican que la suplementación de dietas con *Lactobacillus acidophilus*<sup>149</sup>, así como con extractos de polifenoles de manzana reducen la incidencia del sangrado intestinal<sup>169</sup>. Aunque los mecanismos de acción de estos compuestos no son conocidos, podrían estar relacionados con la capacidad de estos compuestos de reducir tanto el número de lesiones como la inflamación a nivel intestinal.

#### 5.1.4. Efectos sobre la microbiota intestinal

En el presente estudio se observó que la suplementación de la dieta exclusivamente con *Bf* y *Lg* no modifica las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Por el contrario, la suplementación con *Bf*, *Lg* y quercetina produjo un incremento de los recuentos de dichos géneros bacterianos. Estos resultados indican que la administración conjunta de cepas probióticas más quercetina estimula el crecimiento de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, microorganismos que son considerados beneficiosos para la función intestinal<sup>170</sup>, y que además, presentan un efecto protector frente al desarrollo de carcinogénesis en modelos animales inducidos químicamente<sup>171,172</sup>. A pesar de que la relación existente entre microbiota y polifenoles es compleja y todavía poco conocida, se ha propuesto la existencia de una relación bidireccional entre ambos. Por una parte, se sabe que la microbiota intestinal desempeña una función importante en la metabolización de los polifenoles<sup>173,174</sup>, y que determinadas bacterias, como *Lg*, incrementan la biodisponibilidad de los polifenoles cuando se administran de forma conjunta<sup>175,176</sup>. Además, y según estudios recientes, los polifenoles pueden modular la microbiota intestinal, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y estimulando el crecimiento de bacterias con actividad beneficiosa<sup>177</sup>. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo.

#### 5.1.5. Efectos sobre la mucosa colónica

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la suplementación de dietas tanto con *Bf* y *Lg*, como con estos probióticos más quercetina, no solo reduce el número de focos de criptas aberrantes, sino que, también reducen la incidencia y el número de adenomas en colon en los ratones APC<sup>Min/+</sup>. La dieta suplementada con *Bf* y *Lg* redujo el número de focos de criptas y adenomas en un 45% y un 60% respectivamente, mientras que la dieta suplementada con *Bf*, *Lg* y quercetina presentó un mayor efecto, reduciendo el número de focos de criptas aberrantes y de adenomas en un 57% y un 80% respectivamente. Estos resultados se muestran en línea con estudios previos, en los que se observó que la alimentación de ratones inducidos con 1,2-dimetilhidrazina con las cepas probióticas *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus gasseri*, reduce el desarrollo de focos de criptas aberrantes y de microadenomas en un 25% y un 35% respectivamente<sup>131</sup>. Igualmente, estudios previos indican que la administración de *Lactobacillus acidophilus*

microencapsulados reduce la formación de tumores en los ratones  $APC^{Min/+}$ , observándose que la administración de estos probióticos mezclados con yogurt reduce la formación de tumores en colon en un 50%, mientras que la administración de estos mismos probióticos en solución salina reduce la formación de tumores únicamente en un 12,5%<sup>149</sup>. Estos resultados indican que los probióticos pueden incrementar su efecto como consecuencia de sinergias.

Por su parte, se ha descrito que la quercetina reduce la formación de tumores en ratas y ratones inducidos químicamente, provocando un incremento de la apoptosis y reduciendo la proliferación celular<sup>100,178</sup>. Asimismo, estudios previos en ratones de la cepa  $APC^{Min/+}$  muestran que la suplementación de las dietas con quercetina al 0,02% reduce significativamente el número de tumores intestinales<sup>101</sup>. Sin embargo, en este caso la dosis influye en el efecto de la quercetina, observándose que la suplementación de dietas con quercetina al 2% no presenta efecto beneficioso frente al desarrollo de tumores intestinales<sup>179</sup>. Estos resultados parecen indicar que la quercetina tiene efectos beneficiosos únicamente a dosis bajas, similares a las utilizadas en el presente trabajo de investigación.

## 5.2. EFECTOS DE LAS DIETAS SUPLEMENTADAS SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO

### 5.2.1. Efectos sobre el gasto energético y el cociente respiratorio

En el presente estudio se observó que el metabolismo energético de los ratones  $APC^{Min/+}$  presenta una evolución a lo largo del tiempo experimental, posiblemente asociada a la propia evolución de la enfermedad. En la primera fase se observó un incremento del gasto energético, posiblemente por incremento de la masa de tejido con altas tasas metabólicas, como pueden ser masas tumorales, hígado y bazo<sup>180</sup>. Conforme avanzó el período experimental, el gasto energético de los ratones  $APC^{Min/+}$  se redujo paulatinamente hasta llegar a ser significativamente menor que en la cepa salvaje. Esta reducción del gasto energético podría deberse a la reducción de actividad física que se observó, y que es típica en animales que desarrollan caquexia<sup>181</sup>. Los datos existentes referidos a personas, indican que el cáncer puede provocar alteraciones del gasto energético, sugiriéndose que el incremento del gasto energético puede contribuir a la pérdida de peso corporal y al desarrollo de caquexia<sup>70</sup>. Ahora bien, no todos los tumores ejercen los mismos efectos sobre el gasto energético. De hecho, no se ha descrito que el gasto energético de los pacientes con cáncer colorrectal se incremente<sup>69</sup>. Más aún, este gasto energético puede estar reducido en etapas avanzadas del cáncer<sup>182</sup>. En lo que respecta al presente estudio, las dietas suplementadas no modificaron el gasto energético de los ratones  $APC^{Min/+}$ , a pesar de que estudios previos indican que la quercetina incrementa de forma transitoria el gasto energético en ratones sanos<sup>183</sup>.

Además de la alteración del gasto energético, los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control presentaron en la fase final del experimento un incremento significativo del cociente respiratorio respecto de la cepa salvaje, así como del grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con *Bf*, *Lg* y quercetina. Estos cambios podrían ser reflejo de las alteraciones metabólicas de las células tumorales, así como de cambios metabólicos producidos por el desarrollo de la enfermedad tumoral<sup>184</sup>. Recordamos que un CR próximo a la unidad indica el uso predominante de carbohidratos y que valores en torno a 0,7 indican el consumo mayoritario de lípidos. Por tanto, el incremento del valor de cociente respiratorio en los ratones APC<sup>Min/+</sup> podría indicar un mayor consumo de glúcidos, así como un consumo mayoritario de aminoácidos (CR=0,8). En este sentido, se conoce que las células tumorales presentan una mayor demanda de glucosa que las células normales, debido a la mayor proliferación celular, que provoca a su vez una mayor demanda de energía y de cadenas carbonadas. Además, la demanda de glucosa puede verse incrementada porque las células tumorales pueden encontrarse en condiciones de hipoxia o presentar alteraciones a nivel mitocondrial, en ambos casos, las células obtienen energía mediante glucólisis anaerobia, provocando un menor rendimiento energético<sup>68,185,186</sup>. En cuanto a la posibilidad de que el incremento del CR se deba a un aumento del catabolismo proteico, estudios previos en ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup> indican que el catabolismo proteico es la causa de la reducción muscular en dichos ratones<sup>72</sup>. En el presente estudio, aunque no se produjo una reducción significativa del músculo gastrocnemio, el grupo APC<sup>Min/+</sup> alimentado con la dieta control presenta un menor peso del músculo gastrocnemio respecto del resto de grupos. Estos resultados hacen posible que las alteraciones observadas en el cociente respiratorio de los animales APC<sup>Min/+</sup> pudieran ser indicativas del inicio de un incremento del catabolismo proteico, que provoque la pérdida de tejido muscular.

En el presente trabajo la dieta suplementada con *Bf*, *Lg* y quercetina, presentó un mayor efecto que la dieta suplementada únicamente con *Bf* y *Lg*, manteniendo valores de cociente respiratorio iguales al grupo cepa salvaje. Este hecho es destacable, puesto que estudios previos indican que la administración únicamente de quercetina no modifica los valores de cociente respiratorio en ratones de la cepa salvaje alimentados con dieta alta en grasa<sup>183</sup>.



### 5.2.2. Efectos sobre la actividad enzimática y absorción de nutrientes

El desarrollo de enfermedades neoplásicas en el tracto digestivo puede provocar alteraciones de la absorción intestinal de nutrientes. Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian un incremento de la actividad de las enzimas intestinales sacarasa y maltasa, así como de la expresión del transportador de glucosa SGLT-1 en los animales APC<sup>Min/+</sup>. Estos incrementos no se produjeron al suplementar la dieta con *Bf* y *Lg*, solos o más quercetina, manteniéndose en estos casos, niveles similares a los observados en la cepa salvaje. Estos resultados sugieren un posible incremento de la absorción de glucosa en yeyuno en los animales APC<sup>Min/+</sup>, incremento que se revierte como consecuencia de la alimentación con las dietas suplementadas.

La glucosa es el principal monosacárido utilizado como fuente de energía por parte de los organismos y como se ha comentado anteriormente, las células tumorales presentan una mayor demanda de este carbohidrato. Las enzimas sacarasa y maltasa, ambas localizadas en la membrana de borde en cepillo de los enterocitos, son las principales enzimas involucradas en la digestión de disacáridos en individuos adultos. La absorción intestinal de glucosa se produce en contra de gradiente, por lo que es necesaria la acción del cotransportador de glucosa dependiente de sodio SGLT-1, localizado igualmente en la membrana apical de los enterocitos.

Estudios previos han descrito que la actividad del transportador SGLT-1 se encuentra incrementada tanto en yeyuno como en células tumorales de colon en animales APC<sup>Min/+</sup>, sugiriéndose que la pérdida de funcionalidad del gen *Apc* y el incremento de la proteína  $\beta$ -catenina estimulan los sistemas de transporte de glucosa como SGLT-1<sup>187</sup>. Además, se ha observado que la sobreexpresión de EGFR (receptor de factor de crecimiento epitelial) el cual incrementa la supervivencia de los tumores mediante la activación de factores antiapoptóticos, también provoca una mayor expresión de SGLT-1<sup>188,189</sup>. El bloqueo de EGFR provoca la reducción de los niveles de SGLT-1 por degradación, lo que a su vez produce la muerte celular por autofagia<sup>190</sup>. Esto hace que la sobreexpresión de SGLT-1 se haya relacionado con el desarrollo tumoral, proponiéndose que la inhibición de los transportadores de glucosa GLUT 1 y SGLT-1 podrían suponer una estrategia potencial para reducir el crecimiento tumoral<sup>189</sup>.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que tanto la suplementación con *Bf* y *Lg*, así como la combinación de *Bf*, *Lg* y quercetina revierte el incremento de actividad sacarasa, maltasa y de expresión del transportador SGLT-1 que se observa en animales APC<sup>Min/+</sup>. Estos resultados están en la línea de los obtenidos en estudios previos, en los que observan que la ingesta de polifenoles reduce la absorción de glucosa mediante la inhibición competitiva del transportador SGLT-1<sup>191–193</sup>, así como la reducción de su expresión<sup>194</sup>. Sin embargo, es necesario profundizar en

el conocimiento de los mecanismos de acción de dichos compuestos, así como su posible relación con el desarrollo del cáncer colorrectal, ya que estos efectos podrían estar relacionados con el menor desarrollo de lesiones en colon de los animales alimentados con las dietas suplementadas.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los ratones APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control no presentaron alteraciones en la absorción intestinal de aminoácidos. Sin embargo, las dietas suplementadas con *Bf* y *Lg* o con *Bf*, *Lg* y quercetina redujeron significativamente la actividad enzimática de APN y DPP-IV así como la expresión del transportador PEPT-1. A pesar de la importancia de estas enzimas y del transportador PEPT-1 en la absorción de aminoácidos, dicha reducción no provocó signos de malnutrición en los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas. Además de sus implicaciones en la absorción de aminoácidos, se ha propuesto que las enzimas APN y DPP-IV tienen un papel destacado en el desarrollo del cáncer y de inflamación intestinal, por lo que el efecto inhibitor de las dietas suplementadas podría tener un efecto beneficioso frente al desarrollo tumoral, así como de inflamación intestinal. En este sentido, la enzima APN interviene en los procesos de proliferación tumoral, metástasis y angiogénesis inducidos por cáncer <sup>195</sup>, y se considera a los compuestos inhibidores de APN como agentes potencialmente anticarcinogénicos <sup>196</sup>. En el caso de la enzima DPP-IV, estudios previos indican que los inhibidores de DPP-IV presentan un efecto preventivo frente al desarrollo de cáncer colorrectal en ratones inducidos con dimetilhidracina <sup>197</sup>. Asimismo, se ha observado que la administración de compuestos inhibidores de APN y DPP-IV reduce la inflamación en la enfermedad intestinal inflamatoria en ratones <sup>198</sup>. En el caso del transportador PEPT-1, no existen datos que relacionen a este transportador con el desarrollo del cáncer, aunque sí se ha observado que la reducción de los niveles de PEPT-1 tiene un efecto beneficioso sobre enfermedades inflamatorias intestinales <sup>11</sup>.

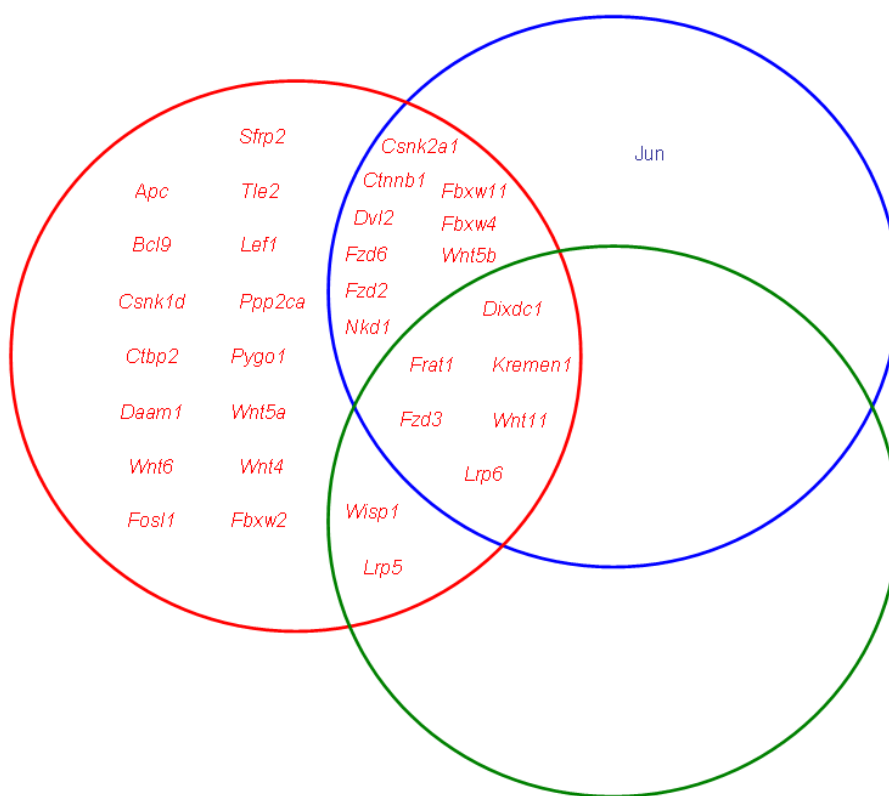
### 5.3. EFECTOS DE LAS DIETAS SUPLEMENTADAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA VÍA WNT

La vía de señalización WNT juega un papel central en diversos procesos fisiológicos, entre los que destaca el control de la proliferación celular durante el desarrollo embrionario <sup>199</sup>, así como en la fase adulta. La correcta regulación de esta vía de señalización es especialmente importante en el desarrollo de algunos tejidos, como por ejemplo, el epitelio intestinal <sup>200</sup>, habiéndose descrito que su desregulación es uno de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de carcinogénesis colorrectal <sup>201</sup>.

El desarrollo de tumores intestinales en los ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup> se produce como consecuencia de la activación constitutiva de la vía canónica WNT. Esta activación se debe a la síntesis de proteína Apc truncada y carente de funcionalidad, consecuencia de una mutación sin

sentido en el codón 850 del gen *Apc*. La importancia de la proteína Apc en la regulación de la proliferación celular radica en que actúa como regulador negativo de la vía canónica WNT, formando parte del complejo de degradación de la proteína  $\beta$ -catenina<sup>14</sup>. En condiciones normales, cuando la vía WNT se encuentra inactiva,  $\beta$ -catenina es degradada constitutivamente por acción del complejo de degradación. Sin embargo, la activación de la vía canónica WNT por medio de señales extracelulares *Wnt* inhibe la formación de dicho complejo, provocando la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina y su translocación al núcleo, donde actúa como cofactor de transcripción de genes relacionados con la proliferación y supervivencia celular<sup>202</sup>. Al igual que en el modelo utilizado en el presente estudio, las alteraciones en el gen *APC* son la principal causa de desarrollo de cáncer colorrectal en humanos, tanto en los casos de cáncer colorrectal hereditario, como esporádico.

El análisis de expresión de genes implicados en la vía WNT, por comparación con la cepa salvaje, mostró una reducción significativa en los niveles de expresión de 32 de los genes estudiados en los ratones de la cepa  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control. La alimentación de los animales  $APC^{Min/+}$  con las dietas suplementadas provoca la recuperación de la expresión de algunos de estos genes hasta niveles similares a la cepa salvaje. De esta forma, el número de genes cuya expresión se vio reducida en el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con *BF* y *Lg* respecto de la cepa salvaje se redujo a 15, observándose además un incremento significativo de la expresión del gen *Jun*. Por su parte, el grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con *Bf*, *Lg* y quercetina únicamente presentó diferencias en 8 genes. En el diagrama de Edwards-Venn de la Figura 5.1 se muestra el grado de solapamiento existente entre los diferentes grupos experimentales. En el que se observa como la alimentación de los animales  $APC^{Min/+}$  con las dietas suplementadas reduce el número de genes cuya expresión se encuentra modificada significativamente respecto de la cepa salvaje. Esta reducción es mayor en los animales  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta suplementada con *Bf*, *Lg* y quercetina. Por tanto, las dietas suplementadas tuvieron un efecto beneficioso sobre la expresión de diversos genes de la vía WNT, asemejándose en mayor medida a la cepa salvaje.



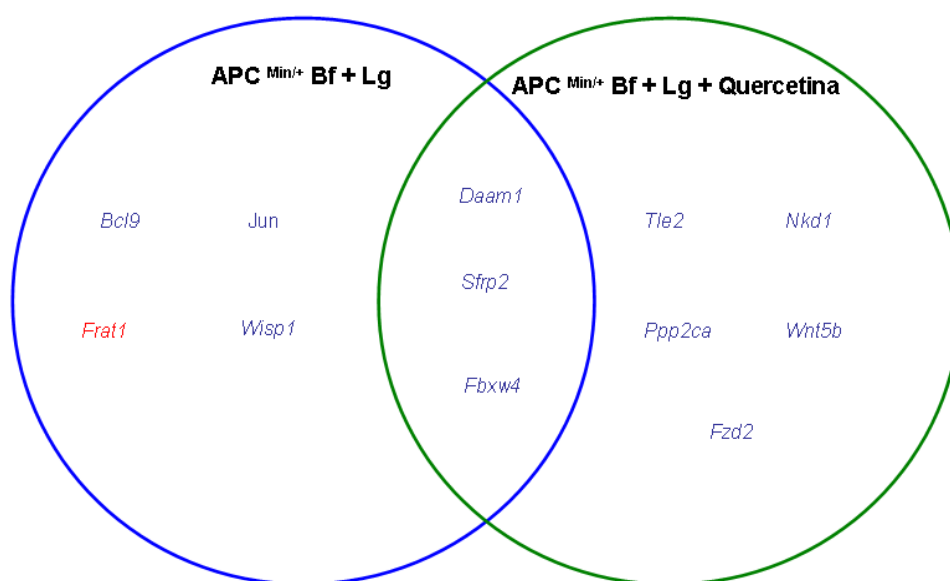
**Figura 5.1.** Diagrama de Edwards-Venn en los que se señalan los genes cuya expresión se encuentra alterada en los ratones APC<sup>Min/+</sup> respecto de la cepa salvaje. (♦): Dieta control, (♦): Dieta (*Bf+Lg*); (♦) Dieta (*Bf+Lg+quercetina*).

Los ratones de la cepa APC<sup>Min/+</sup> mostraron una reducción significativa en la expresión del gen *Apc*, que unida a la síntesis de proteína Apc no funcional, contribuiría a la desregulación de la vía WNT y por tanto al desarrollo de tumores. La administración de *Bf*, *Lg* solos o más quercetina, atenúa la reducción de expresión de *Apc*, recuperando niveles de expresión similares a la cepa salvaje. Estudios previos han descrito la reducción de los niveles de expresión del gen *Apc* en células tumorales como consecuencia de alteraciones epigenéticas, entre las que se sugiere la hipermetilación del promotor<sup>153</sup>. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron cambios en el estado de metilación del promotor del gen *Apc* que puedan explicar las modificaciones de expresión de dicho gen. Por tanto, ni la reducción de la expresión del gen *Apc* observada en los animales APC<sup>Min/+</sup>, ni el incremento de expresión observado en los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dietas suplementadas parecen deberse a cambios en los niveles de metilación del promotor.

Dado el papel de la  $\beta$ -catenina en el desarrollo de cáncer colorrectal, se analizó su expresión por RT-qPCR y Western blot en muestras de colon distal. Dichos resultados indicaron un aumento en la cantidad de la proteína, que se acompañó de una reducción en los niveles de ARNm en los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control respecto de la cepa salvaje. Sin embargo, los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas presentaron niveles de proteína similares a la cepa salvaje, así como una recuperación parcial de la expresión génica. Estos resultados sugieren que la alimentación con las dietas suplementadas modifica la cantidad de  $\beta$ -catenina actuando sobre el complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, ya que los incrementos en la cantidad de dicha proteína se acompañan de reducciones en los niveles de ARNm como consecuencia del mecanismo de compensación correspondiente y viceversa.

En este sentido, se ha observado que la alimentación de los ratones APC<sup>Min/+</sup> con las dietas suplementadas modificó significativamente la expresión de diversos genes de la vía WNT, algunos de los cuales promueven la degradación de  $\beta$ -catenina y actúan como represores de la vía canónica WNT. Se ha propuesto que la acumulación de  $\beta$ -catenina es una de las principales causas de formación de tumores colorrectales, debido a que promueve la expresión de genes diana involucrados en la proliferación y supervivencia como son ciclina-D1 y c-Myc<sup>202</sup>.

En la Figura 5.2 se muestran aquellos genes cuya expresión se ve modificada significativamente en los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas respecto del grupo alimentado con la dieta control. Así mismo, se muestra el grado de solapamiento existente entre ambas dietas. Destacar que en todos los genes en los que se observaron cambios significativos se produjo un incremento de la expresión, con la excepción del gen *Frat1* (*Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas*), cuya expresión se vio reducida en los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta suplementada con Bf y Lg. La proteína codificada por dicho gen inhibe la formación del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina mediante su unión a GSK3- $\beta$ . El gen *Frat* facilita la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina, por lo que actúa como un potente activador de la vía canónica WNT<sup>203,204</sup>. La disminución de su expresión como consecuencia de la alimentación con las dietas suplementadas podría contribuir a la reducción de la acumulación de  $\beta$ -catenina e inhibir la vía canónica WNT.



**Figura 5.2.** Diagramas de Edwards-Venn en los que se señalan los genes cuya expresión se ve modificada significativamente en los ratones  $APC^{Min/+}$  como consecuencia de la alimentación con las dietas suplementadas, respecto de los alimentados con la dieta control. (♦) Dieta (Bf+Lg); (◆) Dieta (Bf+Lg+quercetina).

La alimentación de ratones  $APC^{Min/+}$  con dietas suplementadas con Bf y Lg, con o sin quercetina, incrementó la expresión de los genes *Sfrp2*, *Daam1* y *Fbxw4* respecto del grupo  $APC^{Min/+}$  alimentado con la dieta control. Además, en el caso de los animales  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta suplementada con Bf, Lg y quercetina también se observó un incremento significativo de la expresión de los genes *Ppp2ca*, *Nkd1* y *Tle2* respecto de los animales  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control. Estos genes actúan como inhibidores de la vía canónica WNT, o como represores de la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina.

El gen *Sfrp2* codifica una proteína de la familia *Sfrp* (*secreted frizzled-related protein*), las cuales actúan como inhibidores de la vía WNT a nivel de membrana, inhibiendo competitivamente la unión de los ligandos *Wnt* a los receptores LRP5/6 <sup>205</sup>. Se ha descrito el silenciamiento de *Sfrp2* en líneas tumorales humanas <sup>29,206</sup>. Además, la recuperación de los niveles de expresión normales de *Sfrp2* en la línea celular humana de cáncer de colon DLD-1, reduce la señal WNT, promoviendo la degradación de  $\beta$ -catenina, y reduce la proliferación y supervivencia celular, incrementando el número de células apoptóticas <sup>206</sup>.

El gen *Fbxw4* forma parte de la familia de proteínas con dominios F-box y repeticiones WD-40. A pesar de que la bibliografía referente a este gen es bastante reducida, habiéndose descrito únicamente su alteración en enfermedades como la ectrodactilia <sup>207</sup>, se sabe que la pérdida de expresión o la mutación de proteínas con dominios *F-box* promueve la expresión de oncogenes <sup>208</sup>.

En este sentido, otro gen de la familia (*Fbxw7*) se ha descrito como supresor de tumores, observándose la existencia de mutaciones en dicho gen en una gran variedad de tumores humanos <sup>209</sup>. *Fbxw4* interactúa con el complejo de ubiquitina ligasa, por lo que se sugiere que puede actuar sobre diferentes proteínas y regular la proliferación y supervivencia celular <sup>208</sup>.

El gen *Ppp2ca* codifica para la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa 2 (PP2A- $\alpha$ ), que interviene en la adhesión y la división celular, actuando como regulador del ciclo celular y de la apoptosis <sup>210</sup>. Se ha descrito que su inhibición o pérdida de funcionalidad es característica de transformaciones neoplásicas <sup>211</sup>, y provoca la activación de la señal WNT <sup>212</sup>. PP2A- $\alpha$  incrementa la degradación de  $\beta$ -catenina, favoreciendo la formación del complejo de degradación activando a GSK3- $\beta$  así como actuando directamente sobre  $\beta$ -catenina. La proteína PP2A se considera inhibidora del crecimiento tumoral, más aún, el uso de activadores de PP2A ha demostrado efectos anticarcinogénicos, proponiéndose la regulación de PP2A como un posible objetivo con fines terapéuticos <sup>213</sup>.

Los genes *Daam1* y *Nkd1* son reguladores negativos de la vía de señalización canónica WNT <sup>190</sup> y favorecen la activación de la vía no canónica PCP (*planar polarity cell*) <sup>39 214</sup>, la cual regula los procesos de migración celular durante el desarrollo así como la proliferación celular y angiogénesis <sup>215,216</sup>. En este sentido, estudios realizados en líneas celulares de fibroblastos humanos, así como en embriones de pez cebra, indican que la expresión de *Daam1* promueve la polimerización de axina, estabilizando los microtúbulos del citoesqueleto e inhibe la proliferación celular <sup>216</sup>. Por su parte, la familia de proteínas *Nkd* ejerce su efecto actuando como antagonistas de las señales Wnt y mediante la unión a *DSh/Dvl* <sup>39</sup>.

*Tle2* forma parte de la familia de co-represores de transcripción *Groucho/Tle*, los cuales actúan como reguladores negativos de la transcripción en diversas vías de señalización, incluida la vía de señalización WNT <sup>217</sup>. La acción represora de la transcripción de Groucho/Tle se produce mediante su unión a los factores de transcripción *Tcf/Lef*. La formación de este complejo provoca la unión de histona acetilasa *Rpd3*, que conlleva un incremento de la compactación de la cromatina, inhibiendo de esta forma la transcripción <sup>218</sup>.

En conjunto, todas estas modificaciones conllevarían a una inhibición de la vía canónica WNT, como consecuencia de una mayor degradación de  $\beta$ -catenina y de la represión de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina, tal y como se indica en la Figura 4.19 del apartado de resultados.

Además de los genes anteriormente citados, los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta suplementada con *Bf* y *Lg*, con o sin quercetina presentaron un incremento significativo de la expresión de *Fzd2* y *Wnt5b* y en el caso de la dieta suplementada únicamente con *Bf* y *Lg* también

de los genes *Jun*, *Bcl9* y *Wisp1* respecto de los animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control. A pesar de que los genes *Fzd2* y *Wnt5b* se consideran activadores de la vía WNT<sup>219,220</sup> y que la sobreexpresión de los genes *Jun*, *Bcl9* y *Wisp1* se han relacionado con el incremento de la proliferación y supervivencia celular<sup>221</sup>, así como el desarrollo tumoral<sup>222,223</sup>. Analizando los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis en su conjunto, así como el hecho de que la expresión de estos genes en los grupos APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas es menor que el observado en la cepa salvaje, con la única excepción del gen *Jun*. Sugerimos que la modificación de expresión de estos genes no está relacionada con una actividad anormal de la vía WNT.

En resumen, en este trabajo se aprecia que las dietas suplementadas tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de los animales APC<sup>Min/+</sup>, además de atenuar la pérdida de peso corporal y el sangrado intestinal. Asimismo, ambas dietas reducen el número de lesiones pretumorales en la mucosa de colon, destacando una mayor efectividad con la dieta suplementada con microencapsulados de *Bf*, *Lg* y quercetina. Esta reducción está asociada a cambios en la expresión de diversos genes de la vía WNT que provocan como resultado una disminución de la cantidad de  $\beta$ -catenina. Estos prometedores resultados sugieren la conveniencia de profundizar en el análisis de los efectos beneficiosos de la combinación de *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri* y quercetina microencapsulados en la prevención del cáncer de colon.







## 6). Conclusiones

---



Las principales conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que se analizó el efecto de dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* solos o en combinación con quercetina microencapsulada en animales APC<sup>Min/+</sup>, son las siguientes:

### Objetivo 1

1. Los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas presentan una menor pérdida de peso corporal y de depósitos grasos que el grupo de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control. El grupo de animales de la cepa salvaje no presenta pérdida de peso corporal.
2. Las dietas suplementadas reducen el número de lesiones preneoplásicas en la mucosa de colon, así como el sangrado intestinal asociado al desarrollo de cáncer colorrectal en animales APC<sup>Min/+</sup>. En el grupo de animales de la cepa salvaje no se detectan lesiones en la mucosa colónica, ni presentan sangrado intestinal.
3. La alimentación de ratones APC<sup>Min/+</sup> con dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri* y quercetina incrementa significativamente las poblaciones de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el ciego intestinal respecto a los grupos control, tanto de la cepa salvaje como APC<sup>Min/+</sup>.

### Objetivo 2

4. El gasto energético de los animales APC<sup>Min/+</sup> no se modifica por la alimentación con las dietas suplementadas. Sin embargo, todos los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> presentan una reducción significativa del gasto energético en la fase final del período experimental respecto de la cepa salvaje.
5. La alimentación de ratones APC<sup>Min/+</sup> con dietas suplementadas reduce significativamente la actividad sacarasa y maltasa, y la expresión del transportador de glucosa SGLT-1 en yeyuno respecto del grupo de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dieta control. La actividad enzimática y la expresión del transportador en los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con las dietas suplementadas es similar a la cepa salvaje.
6. La actividad de las peptidasas APN y DPP-IV, y la expresión del transportador de péptidos PEPT-1 se reduce significativamente en los grupos de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con dietas suplementadas respecto al grupo cepa salvaje y al grupo de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta control.

### Objetivo 3

7. En comparación con el grupo de la cepa salvaje, los ratones  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control presentan una reducción significativa de expresión en 32 genes de los 84 analizados, implicados en la vía de señalización celular WNT. Por su parte, la alimentación de los animales  $APC^{Min/+}$  con las dietas suplementadas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* o con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri* y quercetina induce la recuperación de la expresión en 17 y 24 de estos genes respectivamente.
8. Los ratones  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control presentan un incremento significativo de la cantidad de  $\beta$ -catenina en muestras de colon respecto de la cepa salvaje. La alimentación de los ratones  $APC^{Min/+}$  con las dietas suplementadas provoca la reducción de la cantidad de  $\beta$ -catenina en muestras de colon respecto del grupo de animales  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control. Estos valores son similares a los presentados por el grupo de la cepa salvaje.
9. En comparación con el grupo de animales  $APC^{Min/+}$  alimentados con la dieta control:
  - a. La alimentación de los ratones  $APC^{Min/+}$  con la dieta suplementada con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* microencapsulados reduce significativamente la expresión del gen *Frat*, activador de la vía canónica WNT, e incrementa la expresión de los genes *Fbxw4*, *Daam1* y *Sfrp2*, inhibidores de la vía canónica WNT.
  - b. La alimentación de los ratones  $APC^{Min/+}$  con la dieta suplementada con *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri* y quercetina, todos ellos microencapsulados, incrementa la expresión de los genes *Fbxw4*, *Daam1*, *Sfrp2*, *Ppp2Ca* y *Nkd1*, inhibidores de la vía canónica WNT, así como la del co-represor de transcripción *Tle-2*.

## CONCLUSIÓN GENERAL

Los datos obtenidos en el presente trabajo, muestran que la suplementación de dietas con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* solos o en combinación con quercetina microencapsulada, tiene efectos preventivos frente al desarrollo de cáncer colorrectal en el modelo de ratones APC<sup>Min/+</sup>. Se observa que la dieta suplementada con microencapsulados de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus gasseri* en combinación con quercetina presenta una mayor efectividad. El efecto preventivo de dichas dietas frente al desarrollo de lesiones preneoplásicas en colon, podría relacionarse con su capacidad de reducir los niveles de  $\beta$ -catenina mediante la regulación de la expresión de genes implicados en su degradación.





## 7). Bibliografía

---



## 7.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jeejeebhoy KN. Short bowel syndrome: a nutritional and medical approach. *Can Med Assoc J*. 2002;166(10):1297–1302.
2. Fox SI. Fisiología humana. 12ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España,S.A.U.; 2011.
3. Kim SK, Vaishali B, Lee E, Lee S, Lee Y, Kumar TS, et al. Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. *Thromb Res*. 2006;117(4):419–427.
4. Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol*. 2000;81(2):117–143.
5. Crosnier C, Stamataki D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*. 2006;7(5):349–359.
6. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Elsevier; 2011.
7. Castrejón V, Carbó R, Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Rev Educ Bioquímica*. 2007;26(2):49–57.
8. Shirazi-Beechey SP, Moran AW, Batchelor DJ, Daly K, Al-Rammahi M. Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc Nutr Soc*. 2011;70(02):185–193.
9. Wright EM, Martín MG, Turk E. Intestinal absorption in health and disease--sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003;17(6):943–956.
10. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev Chil Nutr*. 2010;37(3).
11. Adibi SA. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(5):G779–788.
12. Gilbert ER, Wong EA, Webb KE. Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci*. 2008;86(9):2135–2155.
13. Simons BD, Clevers H. Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Exp Cell Res*. 2011;317(19):2719–2724.
14. Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*. 2007;40(2):68–81.
15. Kim K-M, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene*. 2002;21(35):5441–5449.
16. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(8):601–614.
17. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653(1):1–24.
18. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to wnt signaling. *Cell*. 2000;103(2):311–320.
19. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159–170.
20. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843–850.

21. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 1991;64(2):231.
22. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*. 1987;50(4):649–657.
23. Franco CA, Liebner S, Gerhardt H. Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19(5):476–483.
24. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Nosho K, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*. 2005;24(53):7946–7952.
25. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res*. 2004;64(14):4717–4720.
26. Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ. Frizzled receptors signal through G proteins. *Cell Signal*. 2013;25(6):1468–1475.
27. Egger-Adam D, Katanaev VL. The trimeric G protein Go inflicts a double impact on axin in the Wnt/frizzled signaling pathway. *Dev Dyn*. 2010;239(1):168–183.
28. Katanaev VL, Ponzelli R, Sémériva M, Tomlinson A. Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila. *Cell*. 2005;120(1):111–122.
29. Suzuki H, Watkins DN, Jair K-W, Schuebel KE, Markowitz SD, Dong Chen W, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004;36(4):417–422.
30. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000;407(6803):535–538.
31. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. 2002;417(6889):664–667.
32. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol*. 2005;4(1):2.
33. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: Arrows point the way. *Development*. 2004;131(8):1663–1677.
34. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn*. 2010;239(1):34–44.
35. Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, et al. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17479–17483.
36. Cook D, Fry MJ, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett JR, Dale TC. Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J*. 1996;15(17):4526–4536.
37. Hecht A, Kemler R. Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep*. 2000;1(1):24–28.
38. Jennings BH, Ish-Horowicz D. The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome Biol*. 2008;9(1).
39. Yan D, Wallingford JB, Sun T-Q, Nelson AM, Sakanaka C, Reinhard C, et al. Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd. *Proc Natl Acad Sci*.

2001;98(7):3802–3807.

40. Huang T, Xie Z, Wang J, Li M, Jing N, Li L. Nuclear factor of activated t cells (nfat) proteins repress canonical wnt signaling via its interaction with dishevelled (dvl) protein and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(43):37399–37405.
41. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:695–723.
42. Eckburg PB. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635–1638.
43. Tannock G. The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. In: Human health: the contribution of microorganisms. London: Springer-Verlag; 1994. p. 1–16.
44. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229–241.
45. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*. 2007;62(11):1223–1236.
46. Chung H, Kasper DL. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(4):455–460.
47. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*. 2013;62(1):159–176.
48. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol*. 2004;12(12):562–568.
49. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2004;93(2-3):97–108.
50. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*. 2006;21(9):517–523.
51. Lewis J, Bray D, Alberts B. Biología molecular de la célula. 3ª ed. Barcelona: OMEGA; 1996.
52. Ruddon RW. Cancer biology. 4th ed. New York: Oxford University Press, Inc.; 2007.
53. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2010;375(9719):1030–1047.
54. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374–1403.
55. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. GLOBOCAN 2008. *globocan.iarc.fr*. 2010;
56. Trilla A. Cribado del cáncer de colon en España: ¿es coste-eficaz? Madrid: Alianza para la Prevención del Cáncer de Colon en España; 2011.
57. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525–532.
58. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kääriäinen H, Ahtola H, Eskelinen M, et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Jun;18(11):2193–2200.

59. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003;138(7):560–570.
60. Söreide K, Janssen EAM, Söiland H, Körner H, Baak JPA. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg.* 2006;93(4):395–406.
61. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759–767.
62. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159–170.
63. Tammariello AE, Milner JA. Mouse models for unraveling the importance of diet in colon cancer prevention. *J Nutr Biochem.* 2010;21(2):77–88.
64. Puppa MJ, White JP, Sato S, Cairns M, Baynes JW, Carson JA. Gut barrier dysfunction in the Apc(Min/+) mouse model of colon cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(12):1601–1606.
65. Tisdale MJ. Wasting in cancer. *J Nutr.* 1999;129(1):243S–246S.
66. Yavuzsen T, Walsh D, Davis M, Kirkova J, Jin T, LeGrand S, et al. Components of the anorexia–cachexia syndrome: gastrointestinal symptom correlates of cancer anorexia. *Support Care Cancer.* 2009;17(12):1531–1541.
67. Lai J-S, Cella D, Peterman A, Barocas J, Goldman S. Anorexia/cachexia-related quality of life for children with cancer. *Cancer.* 2005;104(7):1531–1539.
68. Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, et al. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* 2007;67(19):9013–9017.
69. Fredrix EWHM, Soeters PB, Wouters EFM, Deerenberg IM, von Meyenfeldt MF, Saris WHM. Effect of different tumor types on resting energy expenditure. *Cancer Res.* 1991;51(22):6138–6141.
70. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 2009;89(2):381–410.
71. Douglas RG, Shaw JHF. Metabolic effects of cancer. *Br J Surg.* 1990;77(3):246–254.
72. White JP, Baynes JW, Welle SL, Kostek MC, Matesic LE, Sato S, et al. The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e24650.
73. Holcombe RF, Marsh JL, Waterman ML, Lin F, Milovanovic T, Truong T. Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Mol Pathol.* 2002;55(4):220–226.
74. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet.* 2000;26(2):146–147.
75. De Sousa EMF, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2011;17(4):647–653.
76. Fodde R, Smits R, Hofland N, Kielman M, Meera Khan P. Mechanisms of APC-driven tumorigenesis: lessons from mouse models. *Cytogenet Genome Res.* 1999;86(2):105–111.
77. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2008;30(2):183–196.
78. Nandan MO, Yang VW. Genetic and chemical models of colorectal cancer in mice. *Curr Color*

*Cancer Reports*. 2010;6(2):51–59.

79. Su L, Kinzler K, Vogelstein B, Preisinger A, Moser A, Luongo C, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*. 1992;256(5057):668–670.
80. Moser AR, Mattes EM, Dove WF, Lindstrom MJ, Haag JD, Gould MN. ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):8977–8981.
81. Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2003;5(6):492–499.
82. Joint WHO-FAO Expert Consultation on Diet N. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases: report of a WHO-FAO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization; 2003.
83. Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(3):G401–G424.
84. Fotiadis I, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2008;14(42):6453–6457.
85. Amores R, Calvo A, Maestre JR, Martínez-Hernández D. Probióticos. *Rev Española Quimioter*. 2004;17(2):131–139.
86. Shimizu M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(2):232–241.
87. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):727.
88. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231–1246.
89. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(4):418–425.
90. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1):223S–229S.
91. Corradini E, Foglia P, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat Prod Res*. 2011;25(5):469–495.
92. Meyers KJ, Rudolf JL, Mitchell AE. Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):830–836.
93. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(3):319–328.
94. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(1):6–15.
95. Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, et al. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate*. 2008;68(16):1773–1789.
96. Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, et al. Quercetin decreases the expression

- of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2005;16(3):155–162.
97. Youn H, Jeong J-C, Jeong YS, Kim E-J, Um S-J. Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in H460 lung cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(6):944–951.
  98. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(10):1205–1215.
  99. Dihal AA, de Boer VCJ, van der Woude H, Tilburgs C, Bruijntjes JP, Alink GM, et al. Quercetin, but not its glycosidated conjugate rutin, inhibits azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in F344 rats. *J Nutr*. 2006 Nov 1;136(11):2862–2867.
  100. Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA, Lupton JR, Taddeo SS, Hong MY, et al. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr*. 2009;139(1):101–105.
  101. Murphy EA, Davis JM, McClellan JL, Carmichael MD. Quercetin's effects on intestinal polyp multiplicity and macrophage number in the APC min/+ mouse. *Nutr Cancer*. 2011;63(3):421–426.
  102. Ruiz MJ, Fernández M, Picó Y, Mañes J, Asensi M, Carda C, et al. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J Agric Food Chem*. 2009;57(8):3180–3186.
  103. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: 2001.
  104. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):1052S–1057.
  105. Salminen S, Deighton M, Benno Y, Gorbach S. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. New York: Kluwer Academic Publishers; 2000.
  106. Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(2):245–256.
  107. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr*. 2013;109(S2):S35–S50.
  108. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):365S–373S.
  109. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 1994;35(4):483–489.
  110. García-Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Derangement of mucosal barrier function by bacteria colonizing the rat colonic mucosa. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(12):1019–1026.
  111. Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, et al. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol*. 2003;47(6):371–378.
  112. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2002;109(4):678–684.
  113. Bergonzelli GE, Blum S, Brussow H, Corthésy-Theulaz I. Probiotics as a treatment strategy for



gastrointestinal diseases? *Digestion*. 2005;72(1):57–68.

114. Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006;12(37):5941–5950.
115. De Moreno de LeBlanc A, Perdígón G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell*. 2005;29(1):15–24.
116. Felton JS, Knize MG, Wu RW, Colvin ME, Hatch FT, Malfatti MA. Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutat Res*. 2007;616(1-2):90–94.
117. Turesky RJ. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol Lett*. 2007;168(3):219–227.
118. Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev*. 2013 Jan 1;71(1):23–34.
119. Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol*. 2008;10(7):1442–1452.
120. Oliveira Fuster G, González-Molero I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp*. 2007;22 Suppl 2:26–34.
121. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1256–1264.
122. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr*. 2003;91(441):48–55.
123. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(2):1027–1033.
124. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(6):495–512.
125. Preising J, Philippe D, Gleinser M, Wei H, Blum S, Eikmanns BJ, et al. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(9):3048–3051.
126. Verma A, Shukla G. Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Nutr Cancer*. 2013;65(1):84–91.
127. Vielfort K, Weyler L, Söderholm N, Engelbrecht M, Löfmark S, Aro H. *Lactobacillus* Decelerates Cervical Epithelial Cell Cycle Progression. *PLoS ONE*. 2013 May 10;8(5):e63592.
128. Russo F, Orlando A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutr Cancer*. 2007;59(1):106–114.
129. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer*. 1997;28(1):93–99.
130. Kang J-H, Yun S-I, Park M-H, Park J-H, Jeong S-Y, Park H-O. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* bnr17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS ONE*. 2013;8(1).
131. Foo N-P, Ou Yang H, Chiu H-H, Chan H-Y, Liao C-C, Yu C-K, et al. Probiotics prevent the

development of 1,2-dimethylhydrazine (dmh)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. *J Agric Food Chem.* 2011;59(24):13337–13345.

132. Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A, et al. A synbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr.* 2005;135(5):996–1001.
133. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievense LC. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis.* 1998;19(2):281–285.
134. Hervet-Hernández D, Goñi I. Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Rev Int.* 2011;27(2):154–169.
135. Håkansson Å, Bränning C, Molin G, Adawi D, Hagslätt M-L, Jeppsson B, et al. Blueberry husks and probiotics attenuate colorectal inflammation and oncogenesis, and liver injuries in rats exposed to cycling dss-treatment. *PLoS ONE.* 2012;7(3).
136. Bansal SS, Goel M, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2011;4(8):1158–1171.
137. Chávarri M, Marañoñ I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán M del C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int J Food Microbiol.* 2010;142(1-2):185–189.
138. Paulsen JE, Steffensen I-L, Løberg EM, Husøy T, Namork E, Alexander J. Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the Min/+ mouse colon. *Cancer Res.* 2001;61(13):5010–5015.
139. Ostrow JD. Tests for fecal occult blood. In: Clinical Methods: The history, physical and laboratory examinations. Boston: 1990.
140. Ogilvie GK, Walters LM, Fettman MJ, Hand MS, Salman MD, Wheeler SL. Energy expenditure in dogs with lymphoma fed two specialized diets. *Cancer.* 1993;71(10):3146–3152.
141. Weir JB de V. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol Biochem.* 1949;109(1-2):1–9.
142. García-Díaz D, Campion J, Milagro F, Lomba A, Marzo F, Martínez J. Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. *J Physiol Biochem.* 2007;63(4):337–346.
143. Shirazi-Beechey SP, Davies AG, Tebbutt K, Dyer J, Ellis A, Taylor CJ, et al. Preparation and properties of brush-border membrane vesicles from human small intestine. *Gastroenterology.* 1990;98(3):676–685.
144. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248–254.
145. Dahlqvist A. Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem.* 1964;7(1):18–25.
146. Andria G, Cucchiara S, Vizia B de, Ritis G de, Mazzacca G, Auricchio S. Brush border and cytosol peptidase activities of human small intestine in normal subjects and celiac patients. *Pediatr Res.* 1980;14(6):812–818.
147. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta Ct$  method. *Methods.* 2001;25(4):402–408.
148. Coletta PL, Muller AM, Jones EA, Muhl B, Holwell S, Clarke D, et al. Lymphodepletion in the

ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Blood*. 2004;103(3):1050–1058.

149. Urbanska A, Bhathena J, Martoni C, Prakash S. Estimation of the potential antitumor activity of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *Dig Dis Sci*. 2009;54(2):264–273.
150. Fredrix EWHM, Soeters PB, Wouters EFM, Deerenberg IM, von Meyenfeldt MF, Saris WHM. Effect of different tumor types on resting energy expenditure. *Cancer Res*. 1991 Nov 15;51(22):6138–6141.
151. Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med*. 2008 Jun 1;49(Suppl\_2):24S–42.
152. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*. 1990;247(4940):322–324.
153. Segditsas S, Sieber OM, Rowan A, Setien F, Neale K, Phillips RKS, et al. Promoter hypermethylation leads to decreased APC mRNA expression in familial polyposis and sporadic colorectal tumours, but does not substitute for truncating mutations. *Exp Mol Pathol*. 2008;85(3):201–206.
154. Mehl KA, Davis JM, Berger FG, Carson JA. Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic ApcMin/+ mouse. *J Appl Physiol*. 2005;99(6):2379–2387.
155. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*. 1990 Jan 19;247(4940):322–324.
156. You S, Ohmori M, Peña MMO, Nassri B, Quito J, Al-Assad ZA, et al. Developmental abnormalities in multiple proliferative tissues of ApcMin/+ mice. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(3):227–236.
157. Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MMO, Davis JM, Muga SJ, Carson JA. Interleukin-6 and cachexia in ApcMin/+ mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(2):R393–401.
158. Asha, Gayathri D. Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Exp Ther Med*. 2012;3(6):1049–1054.
159. Siddiqui RA, Hassan S, Harvey KA, Rasool T, Das T, Mukerji P, et al. Attenuation of proteolysis and muscle wasting by curcumin c3 complex in MAC16 colon tumour-bearing mice. *Br J Nutr*. 2009;102(07):967–975.
160. Camargo CA, da Silva MEF, da Silva RA, Justo GZ, Gomes-Marcondes MCC, Aoyama H. Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406(4):638–642.
161. Yeh K-Y, Wang H-M, Chang JW-C, Huang J-S, Lai C-H, Lan Y-J, et al. Omega-3 fatty acid-, micronutrient-, and probiotic-enriched nutrition helps body weight stabilization in head and neck cancer cachexia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116(1):41–48.
162. Tian M, Kliewer KL, Asp ML, Stout MB, Belury MA. c9t11-Conjugated linoleic acid-rich oil fails to attenuate wasting in colon-26 tumor-induced late-stage cancer cachexia in male CD2F1 mice. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(2):268–277.
163. Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, Udagawa T, Ishikawa T, Horii I, et al. Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice. *Cancer Res*. 1990;50(8):2290–2295.
164. Mehl KA, Davis JM, Clements JM, Berger FG, Pena MM, Carson JA. Decreased intestinal polyp multiplicity is related to exercise mode and gender in ApcMin/+ mice. *J Appl Physiol*. 2005;98(6):2219–2225.

165. Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T. The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*. 2007;13(6):821–825.
166. Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen C-Y, Blumberg JB. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr*. 2006;136(1):39–44.
167. Phromnoi K, Yodkeeree S, Anuchapreeda S, Limtrakul P. Inhibition of MMP-3 activity and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line by bioflavonoids. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(8):1169–1176.
168. Weng C-J, Yen G-C. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1-2):323–351.
169. Fini L, Piazzzi G, Daoud Y, Selgrad M, Maegawa S, Garcia M, et al. Chemoprevention of intestinal polyps in ApcMin/+ mice fed with western or balanced diets by drinking annurca apple polyphenol extract. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2011;4(6):907–915.
170. Dolara P, Luceri C, Filippo CD, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, et al. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mech Approaches Chemoprevention Mutat Cancer*. 2005;591(1–2):237–246.
171. Tuohy K, Rouzaud G, Bruck W, Gibson G. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics - assessment of efficacy. *Curr Pharm Des*. 2005;11(1):75–90.
172. Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem*. 2009 Oct;20(10):743–752.
173. Bolca S, Van de Wiele T, Possemiers S. Gut metabolites govern health effects of dietary polyphenols. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(2):220–225.
174. Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*. 2013;24(8):1415–1422.
175. Tamura M, Ohnishi-Kameyama M, Shinohara K. Lactobacillus gasseri: effects on mouse intestinal flora enzyme activity and isoflavonoids in the caecum and plasma. *Br J Nutr*. 2004;92(05):771–776.
176. Chen H, Hayek S, Rivera Guzman J, Gillitt ND, Ibrahim SA, Jobin C, et al. The microbiota is essential for the generation of black tea theaflavins-derived metabolites. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e51001.
177. Kemperman RA, Bolca S, Roger LC, Vaughan EE. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology*. 2010;156(11):3224–3231.
178. Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1450–1456.
179. Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, et al. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*. 2000 May 1;21(5):921–927.
180. Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD, McCargar LJ, Prado CMM, Baracos VE. A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(4):1173–1179.
181. Van Norren K, Kegler D, Argiles JM, Luiking Y, Gorselink M, Laviano A, et al. Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice. *Br J Cancer*. 2009;100(5):713–722.

182. Moses AWG, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KCH. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer*. 2004;90(5):996–1002.
183. Stewart LK, Soileau JL, Ribnicky D, Wang ZQ, Raskin I, Poulev A, et al. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. 2008;57(Supplement 1):S39–S46.
184. Vaisman N, Lusthaus M, Niv E, Santo E, Shacham-Shmueli E, Geva R, et al. Effect of tumor load on energy expenditure in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. 2012;41(2):230–232.
185. Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med*. 2008;49(Suppl\_2):24S–42.
186. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;292(1):C125–136.
187. Rexhepaj R, Rotte A, Gu S, Michael D, Pasham V, Wang K, et al. Tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli downregulates intestinal transport. *Eur J Physiol*. 2011;461(5):527–536.
188. Perez R, Crombet T, Leon J de, Moreno E. A view on EGFR-targeted therapies from the oncogene-addiction perspective. *Front Pharmacol*. 2013;4(53).
189. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther*. 2009;121(1):29–40.
190. Guo GF, Cai YC, Zhang B, Xu RH, Qiu HJ, Xia LP, et al. Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Med Oncol*. 2010;28(S1):197–203.
191. Manzano S, Williamson G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(12):1773–1780.
192. Sato S, Takeo J, Aoyama C, Kawahara H. Na<sup>+</sup>-Glucose cotransporter (SGLT) inhibitory flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(10):3445–3449.
193. Ader P, Blöck M, Pietzsch S, Wolfram S. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Lett*. 2001;162(2):175–180.
194. Oliveira DM, Freitas HS, Souza MFF, Arcari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, et al. Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal sglt1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats. *J Agric Food Chem*. 2008;56(22):10527–10532.
195. Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: Chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev*. 2006;26(1):88–130.
196. Su L, Jia Y, Wang X, Zhang L, Fang H, Xu W. Discovery of a synthetic Aminopeptidase N inhibitor LB-4b as a potential anticancer agent. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(9):2512–2517.
197. Femia AP, Raimondi L, Maglieri G, Lodovici M, Mannucci E, Caderni G. Long-term treatment with Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, reduces colon carcinogenesis and reactive oxygen species in 1,2-dimethylhydrazine-induced rats. *Int J Cancer*. 2013;
198. Bank U, Heimburg A, Helmuth M, Stefin S, Lendeckel U, Reinhold D, et al. Triggering endogenous immunosuppressive mechanisms by combined targeting of Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) and Aminopeptidase N (APN/ CD13)--a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*. 2006 Dec 20;6(13-14):1925–1934.



199. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 2005;15(1):28–32.
200. Kühl SJ, Kühl M. On the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(2):2297–2306.
201. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MMW, Sancho E, Huls G, et al. B-catenin and tcf mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of ephb/ephrinb. *Cell.* 2002;111(2):251–263.
202. Liu H-P, Gao Z-H, Cui S-X, Sun D-F, Wang Y, Zhao C-R, et al. Inhibition of intestinal adenoma formation in apcmin/+ mice by riccardin d, a natural product derived from liverwort plant dumortiera hirsuta. *PLoS ONE.* 2012;7(3).
203. Van Amerongen R, Berns A. Re-evaluating the role of Frat in Wnt-signal transduction. *Cell Cycle.* 2005;4(8):1065–1072.
204. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 2007;13(14):4042–4045.
205. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9–26.
206. Zhang Y, Chen H. Genistein attenuates WNT signaling by up-regulating sFRP2 in a human colon cancer cell line. *Exp Biol Med.* 2011;236(6):714–722.
207. Everman DB, Morgan CT, Lyle R, Laughridge ME, Bamshad MJ, Clarkson KB, et al. Frequency of genomic rearrangements involving the SHFM3 locus at chromosome 10q24 in syndromic and non-syndromic split-hand/foot malformation. *Am J Med Genet A.* 2006;140A(13):1375–1383.
208. Lockwood WW, Chandel SK, Stewart GL, Erdjument-Bromage H, Beverly LJ. The novel ubiquitin ligase complex, scfbbxw4, interacts with the cop9 signalosome in an f-box dependent manner, is mutated, lost and under-expressed in human cancers. *PLoS ONE.* 2013;8(5).
209. Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res.* 2007;67(19):9006–9012.
210. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001;353(Pt 3):417–439.
211. Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1795(1):1–15.
212. Sablina AA, Hector M, Colpaert N, Hahn WC. Identification of PP2A Complexes and Pathways Involved in Cell Transformation. *Cancer Res.* 2010;70(24):10474–10484.
213. Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):e229–e238.
214. Zeng W, Wharton KA, Mack JA, Wang K, Gadbow M, Suyama K, et al. Naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature.* 2000;403(6771):789–795.
215. Cirone P, Lin S, Griesbach HL, Zhang Y, Slusarski DC, Crews CM. A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11(4):347–360.
216. Ju R, Cirone P, Lin S, Griesbach H, Slusarski DC, Crews CM. Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(15):6906–6911.
217. Sekiya T, Zaret KS. Repression by Groucho/TLE/Grg Proteins: Genomic Site Recruitment Generates Compacted Chromatin In Vitro and Impairs Activator Binding In Vivo. *Mol Cell.* 2007;28(2):291–

303.

- 218. Brantjes H, Roose J, van De Wetering M, Clevers H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(7):1410–1419.
- 219. Li C, Chen H, Hu L, Xing Y, Sasaki T, Villosis MF, et al. Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. *BMC Mol Biol.* 2008;9(1).
- 220. Armas P, Margarit E, Mouguelar VS, Allende ML, Calcaterra NB. Beyond the binding site: in vivo identification of *tbx2*, *smarca5* and *wnt5b* as molecular targets of *cnbp* during embryonic development. *PLoS ONE.* 2013;8(5).
- 221. Shaulian E. AP-1 — The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 2010;22(6):894–899.
- 222. Sakamoto I, Ohwada S, Toya H, Togo N, Kashiwabara K, Oyama T, et al. Up-regulation of a BCL9-related b-catenin-binding protein, B9L, in different stages of sporadic colorectal adenoma. *Cancer Sci.* 2007;98(1):83–87.
- 223. Wang J, Zhang GY, Li XH. Effect of indomethacin on Bfl-1, WISP-1 and proliferating cell nuclear antigen in colon cancer cell line HCT116 cells. *Chin J Dig Dis.* 2006;7(4):219–224.





## 8). Anexos

---



## 8.1. ANEXO I

En la Tabla 8.1 se muestran el proceso de preparación de los diferentes medios de cultivo utilizados para la realización de recuentos de microorganismos en heces (apartado 3.1.5 de material y métodos).

**Tabla 8.1.** Preparación de medios de cultivo utilizados para el recuento de microorganismos en heces

| Medio            | Preparación   |
|------------------|---|
| MRS              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Medio MRS(52g/l)</li> <li>Agar bacteriológico (15g/l).</li> <li>Se calentó hasta su completa disolución y posteriormente se esterilizó mediante autoclave, 15 minutos a 121°C.</li> <li>Se prepararon las placas de agar (20 ml/placa) y se dejaron enfriar hasta que solidificó.</li> </ul> |
| BHI agar         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Medio BHI agar (52g/l).</li> <li>Se calentó hasta su completa disolución, y posteriormente se esterilizó mediante autoclave, 15 min a 121°C.</li> <li>Se prepararon las placas de agar (20 ml/placa) y se dejaron enfriar hasta que solidificó.</li> </ul>                                   |
| Schaedler agar   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Medio Schaedler agar (43,3g/l).</li> <li>Se calentó hasta que se disolvió completamente y posteriormente se esterilizó mediante autoclave, 15 min a 121°C.</li> <li>Se prepararon las placas de agar (20 ml/placa) y se dejaron enfriar hasta que solidificó.</li> </ul>                     |
| Para clostridios | <ul style="list-style-type: none"> <li>Medio reforzado para clostridios (52,5g/l).</li> <li>Se calentó hasta que se disolvió completamente y posteriormente se esterilizó mediante autoclave, 15 min a 121°C.</li> <li>Se prepararon las placas de agar (20 ml/placa) y se dejaron enfriar hasta que solidificó.</li> </ul>         |
| VRBG             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Medio VRBG (39,5g/l).</li> <li>Se calentó hasta su disolución y se llevó a ebullición durante 2 minutos. No se esterilizó en autoclave.</li> </ul>   |
| VRBL             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Medio VRBL (39,5g/l). Se calentó hasta su disolución y se llevó a ebullición durante 2 minutos.</li> <li>Se calentó hasta su disolución y se llevó a ebullición durante 2 minutos. No se esterilizó en autoclave.</li> </ul>   |

## 8.2. ANEXO II

### 8.2.1. Obtención de ADN control para la PCR específica de metilación

Como control positivo de ADN metilado se utilizó el DNA comercial *Universal Methylated DNA Standard* (Zymo Research Corporation, Irvine, California, EE. UU).

El control positivo de ADN no metilado se obtuvo mediante la realización de PCR específicas para cada uno de los genes, amplificando y purificando posteriormente el producto obtenido. Para este fin, se extrajo ADN a partir de una muestra de colon proximal de uno de los animales pertenecientes a la cepa salvaje. Este ADN se utilizó como molde a partir del cual amplificar las regiones del promotor de los genes a estudiar. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit *Wizard® Genomic DNA purification* (Promega, Wisconsin, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se diseñaron cebadores para amplificar la región de ADN que contenía la secuencia de cada uno de los genes (*Apc* y *Fbxw4*) que posteriormente se amplificaría mediante PCR específica de metilación. Los cebadores y las condiciones empleadas en la reacción de PCR para obtener los controles positivos de ADN no metilado de cada uno de los genes en estudio se muestran en las Tablas 3.3 y 3.4 respectivamente.

**Tabla 8.2.** Cebadores utilizados para la obtención de ADN control para los genes *Apc* y *Fbxw4*.

| GEN <i>Apc</i>                            |                        | GEN <i>Fbxw4</i>                          |                         |
|---|------------------------|---|-------------------------|
| Cebadores                                 | 5'AAGGTGAGCAGGTTAGAG3' | Cebadores                                 | 5'CACACGCTTCAACTAGATG3' |
|   | 5'CAGGAAGGCGTACATAGG3' |   | 5'TTCCCTTTCCCTTGCTTT3'  |
| Condiciones obtención del producto de PCR |                        | Condiciones obtención del producto de PCR |                         |
| Reactivos                                 | Volumen (μL)           | Reactivos                                 | Volumen (μL)            |
| H <sub>2</sub> O                          | 28                     | H <sub>2</sub> O                          | 28                      |
| DNTP's (5μM)                              | 0,5                    | DNTP's (5μM)                              | 0,5                     |
| Cebador APC-F (5μM)                       | 2                      | Cebador APC-F (5μM)                       | 2                       |
| Cebador APC-R (5μM)                       | 2                      | Cebador APC-R (5μM)                       | 2                       |
| Mg <sup>2+</sup>                          | 2                      | Mg <sup>2+</sup>                          | 2                       |
| Buffer 10x                                | 5                      | Buffer 10x                                | 5                       |
| Taq Polimerasa (5U/μL)                    | 0,5                    | Taq Polimerasa (5U/μL)                    | 0,5                     |
| Muestra ADN (50ng/ μL)                    | 5                      | Muestra ADN (50ng/ μL)                    | 5                       |

**Tabla 8.3.** Condiciones de PCR para la obtención de ADN control de los genes *Apc* y *Fbxw4*.

| Proceso                   | GEN <i>Apc</i> |        |           | GEN <i>Fbxw4</i> |        |           |
|---------------------------|----------------|--------|-----------|------------------|--------|-----------|
|                           | Temperatura    | Tiempo | Nº ciclos | Temperatura      | Tiempo | Nº ciclos |
| Desnaturalización inicial | 94°C           | 10 min | 1         | 94°C             | 10 min | 1         |
| Desnaturalización         | 94°C           | 20 s   | 35        | 94°C             | 20 s   | 35        |
| Emparejamiento            | 63°C           | 45 s   |           | 58°C             | 45 s   |           |
| Extensión                 | 72°C           | 45 s   |           | 72°C             | 45 s   |           |
| Extensión final           | 72°C           | 10 min | 1         | 72°C             | 10 min | 1         |

- Se realizó la reacción de PCR en las condiciones expuestas en la Tabla 8.3 para cada uno de los genes.
- Los productos de PCR se purificaron en geles de agarosa de una concentración del 1% (Pronadisa, Torrejón de Ardoz, España).
- Se recortó del gel la banda de ADN con el tamaño correspondiente al producto de la PCR, recogiendo sobre una columna de centrifugación (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.).
- Se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Biofuge fresco (Heraeus centrifuge, Buckinghamshire, Inglaterra.).
- Tras la centrifugación la agarosa queda en el filtro de la columna y el producto de la PRC se recoge en el vial inferior.
- Se midió la absorbancia (a una longitud de onda de 260 nm) de la muestra obtenida para calcular su concentración utilizando un espectrofotómetro *Picodrop Microlitre* (Picodrop, Saffron Walden, Reino Unido). Además se realizó una medición de la absorbancia a 280 nm para calcular la pureza de la muestra mediante el siguiente cálculo:

$$R = \text{Abs}_{260\text{nm}} / \text{Abs}_{280\text{nm}}$$

### 8.2.2. Clonado de los productos de PCR

El clonado de los productos de PCR se realizó utilizando el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU). La reacción de ligación del inserto y del vector se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

| Reactivo                         | Volumen      |
|----------------------------------|--------------|
| Tampón 2X                        | 5 µl         |
| Vector pGEM <sup>®</sup> -T Easy | 1 µl (50 ng) |
| Inserto                          | n µl (25ng)  |
| Ligasa T4                        | 1 µl = 3 UW  |
| dH <sub>2</sub> O                | Hasta 10 µl  |

La mezcla de reacción se incubó toda la noche a 4°C.

### 8.2.3. Transformación

Los productos de ligación se transformaron en células competentes comerciales (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU), siguiendo el siguiente protocolo.

- Se descongelan las células competentes en hielo.
- Se enfría en hielo durante 15 minutos un tubo de 15 ml y posteriormente se añaden 200 µl de células competentes y 10 µl del producto de ligación.
- Se incuba en un baño termostático a 42° C durante 45 minutos.
- Se incuba en hielo durante 2 minutos.
- Se añaden al tubo 500 µl de medio LB líquido.
- Incubar con agitación a 37°C durante 1 hora, dándole unos golpecitos a los tubos a los 30 y 45 minutos.
- Sembrar 350 µl de células transformadas en placas de agar LB+Ampicilina.
- Una vez sembradas, mantener de 3 a 4 minutos las placas un poco abiertas cerca de la llama.
- Incubar las placas en la estufa, boca abajo, a 37° durante 16-18 horas.

Para preparar el medio líquido LB se diluyeron 5 gramos de Base de Caldo Luria (Cultimed, Lardero, La Rioja, España) en 250 ml de agua destilada y se autoclavó la mezcla.

Para preparar las placas de agar se diluyeron 5 gramos de Base de Caldo Luria y 3,75 gramos de Bacto™ Agar (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, EE. UU) en 250 ml de agua destilada. La mezcla se autoclavó y se dejó enfriar. Una vez fría, se le añadieron 250 µl de ampicilina (Roche, Madrid, España) a 50 µg/µl, quedando así el antibiótico a una concentración final de 0,05 µg/µl. A continuación se añadieron 25 ml de esta solución en cada placa y se mantuvieron las placas abiertas cerca de la llama durante 3 o 4 minutos. Las placas se sellaron con parafilm y se almacenaron boca abajo a 4°C hasta su utilización.

#### **8.2.4. Amplificación de colonias**

Para amplificación de las colonias transformadas que habían crecido en la placa se empleó el siguiente protocolo.

- Se preparó 1 tubo de 50 ml por cada colonia a amplificar añadiéndole 6 ml de LB-ampicilina (concentración final de ampicilina (0,05 µg/ µl).
- Se recogió de la placa una colonia aislada con un asa de siembra estéril y se introdujo en el tubo de LB-ampicilina.
- Se incubó el tubo a 37°C entre 16-18 horas en agitación constante.

Con el fin de obtener una reserva de bacterias transformadas con el plásmido recombinante de interés se congeló parte del cultivo. Con este fin se mezclaron 1200 µl de cultivo con 200 µl de glicerina en un tubo de 1,5 ml con tapón de rosca, se invirtió el tubo varias veces y se almacenó a -80°C.

#### **8.2.5. Extracción de plásmidos y análisis de su estructura**

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit “E.Z.N.A. *Plasmid mini-prep I*” (Omega Bio-tek Inc., Norcross, Georgia, EE. UU) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La estructura de los plásmidos se confirmó por restricción y posterior secuenciación.

Las reacciones de restricción se realizaron en las condiciones que se muestran en la Tabla 3.5.

**Tabla 8.4.** Condiciones de restricción del plásmido.

| Reactivo           | Volumen                  |
|--------------------|--------------------------|
| Plásmido           | 1 $\mu$ l                |
| Tampón de reacción | 2 $\mu$ l                |
| Enzima EcoR1       | 2 $\mu$ l (25U/ $\mu$ l) |
| dH <sub>2</sub> O  | 15 $\mu$ l               |
| Volumen Total      | 20 $\mu$ l               |

- Se utilizó la enzima de restricción EcoR1. La caja de clonado del vector presenta una diana de corte a cada lado del punto de inserción.
- El producto de digestión se analizó en un gel de agarosa al 2%, se cortó la banda de tamaño correspondiente al inserto y se recogió sobre una columna de centrifugación (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.).
- Se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Biofuge fresco (Heraeus centrifuge, Buckinghamshire, Inglaterra.).
- Tras la centrifugación la agarosa queda en el filtro de la columna y el producto de la PRC se recoge en el vial inferior.
- Se secuenció el inserto con el fin de comprobar que coincidía con la secuencia obtenida mediante búsqueda bibliográfica. La secuenciación de dichos insertos se contrató con el Servicio de Secuenciación de ADN de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.